

# **Utskillelse av testosteronmetabolitter etter anvendelse av testosteron i forskjellige applikasjonsformer**

Thomas Svendsen Selmer



Avdeling for farmasøytisk kjemi,  
Farmasøytisk institutt,  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet,  
Universitetet i Oslo

UNIVERSITETET I OSLO

15. mai 2012



# **Utskillelse av testosteronmetabolitter etter anvendelse av testosteron i forskjellige applikasjonsformer**

Thomas Svendsen Selmer

## **Veiledere:**

Cand. Scient. Ingunn Hullstein  
Norges laboratorium for dopinganalyse,  
Oslo Universitetssykehus

Prof. Dr. Peter Hemmersbach  
Farmasøytisk institutt/  
Norges laboratorium for dopinganalyse,  
Oslo Universitetssykehus

Masteroppgave i legemiddelanalyse  
Avdeling for farmasøytisk kjemi,  
Farmasøytisk institutt,  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet,

UNIVERSITETET I OSLO

© Thomas Svendsen Selmer

2012

Utskillelse av testosteronmetabolitter etter anvendelse av testosteron i forskjellige applikasjonsformer

Thomas Svendsen Selmer

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

# Sammendrag

Endringer i steroidprofil i urin kan indikere misbruk av testosteron eller dens forløpere, og bruk av steroidprofiler har vært en del av rutineanalysene innen dopingkontroll siden 1980-tallet. Den viktigste parameteren som undersøkes, er forholdet mellom testosteron og epitestosteron, (T/E-ratio), da utskillelse av epitestosteron ikke vil påvirkes av testosterontilførsel. En stor inter-individuell variasjon i steroidkonsentrasjoner og ratio gjør det imidlertid problematisk å basere utvelgelse av mistenkelige prøver på dagens populasjonsbaserte kriterier. Genetisk variasjon er den viktigste årsaken til denne inter-individuelle variasjonen i utskillelse av testosteronmetabolitter. UGT2B17-genet koder for et enzym som er sentral i glukuronideringen av testosteron. En delesjon i dette genet forekommer hos en stor andel asiater i forhold til kaukasiere.

Hensikten med oppgaven var å undersøke hvordan steroidprofilen påvirkes i menn, med hensyn til UGT2B17-genotype, etter anvendelse av lave doser testosteron i form av gel (Testogel®) og injeksjon (Testoviron® Depot). Videre skulle det undersøkes om deltagerne oversteg WADA's populasjonsbaserte grense på  $T/E > 4$ , etter testosterontilførsel. Det skulle også undersøkes om det var mulig å bekrefte lave doser testosteron eller testosteronmetabolitter av eksogent opphav, ved hjelp av IRMS.

10 friske, frivillige menn i alderen 20-30 år ble rekruttert til studien. En blodprøve ble tatt for bestemmelse av UGT2B17-genotype. Før administrasjon av testosteron ble det samlet inn fem blankprøver for å etablere deltagerens baseline steroidprofil. Testosteron gel (50 mg) ble påført én gang daglig i én uke. Etter en utvaskelsesperiode mottok deltagerne en intramuskulær testosteroninjeksjon (125 mg). Det ble tatt urinprøver daglig under gelperioden og de syv påfølgende dagene, samt hver dag i 14 dager etter injeksjon. Prøvene ble opparbeidet ved hjelp av væske-væske ekstraksjon og videre analysert ved GC-MS. De endogene steroidene ble kvantifisert ved hjelp av en fem punkts kalibreringskurve. Utvalgte prøver ble i tillegg analysert ved IRMS, og det ble også utført LH-analyse ved fluoroimmunoassay på noen av prøvene.

Genotyping viste at en deltager (10 %) hadde homozygot delesjon i begge alleler (*del/del*) av UGT2B17-genet, noe som er i samsvar med tidligere studier på forekomst av denne genvarianten blant kaukasiere. Analysen av urinprøvene viste at steroidprofilen hos menn påvirkes av UGT2B17-genotype, og da spesielt med hensyn til konsentrasjon av testosteron

## Sammendrag

og T/E-ratio. Individer med to intakte alleler (*ins/ins*) og ett intakt allel (*ins/del*) viste generelt høyere utskillelse av testosteronmetabolitter i urin enn individet med *del/del*-genotype. Videre viste resultatene at to deltagere aldri oversteg WADA's reaksjonsgrense på  $T/E > 4$  etter administrasjon av testosteron. Den inter-individuelle variasjonen i T/E-ratio er mye større enn den intra-individuelle variasjonen. En individbasert grense synes derfor å være mer hensiktsmessig enn dagens populasjonsbaserte grense. IRMS-resultatene viste at det kan være en utfordring å bekrefte tilførsel av eksogent testosteron i lave doser.

# Forord

Denne masteroppgaven er utført ved Norges Laboratorium for Dopinganalyse ved Oslo universitetssykehus.

Tusen takk til alle som har hjulpet meg i arbeidet med oppgaven.

En spesiell takk rettes til hovedveileder Ingunn Hullstein for god og engasjert veiledning fra start til slutt. Takk også til veileder Peter Hemmersbach for all hjelp og innspill underveis.

Tusen takk til alle deltakerne som villig har stilt opp og bidratt med prøver til studien.

Jeg vil også få takke alle ansatte ved Norges Laboratorium for dopinganalyse for at dere gjør arbeidsmiljøet åpent og inkluderende. Det har aldri vært noe problem å få hjelp med hverken faglige eller praktiske spørsmål. Spesiell takk til Lillian for hjelp i forbindelse med blodprøvetaking. En spesiell takk rettes også til Kjersti og Carlos for all hjelp og bidrag i forbindelse med IRMS-analyse.

En stor takk rettes også til ansatte ved Hormonlaboratoriet for hjelp med LH-analyse. Takk også til Avdeling for vekst og reproduksjon ved Rigshospitalet i København for hjelp med genanalyse.

Jeg vil også benytte anledningen til å takke Antidoping Norge for økonomisk støtte til prosjektet.

Takk til venner og familie for støtte og oppmuntrende ord.

Sist, men ikke minst, vil jeg takke min kjære kone Reidun. Tusen takk for uvurderlig støtte og oppmuntring du har gitt meg, samt hjelp med korrekturlesing og tekniske utfordringer. I en travel tid har du vartet opp med middager og generelt stell. Jeg gleder meg til en god ferie med deg når studiet mitt snart er gjennomført!

Oslo, mai 2012

Thomas Svendsen Selmer





# Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Doping i idretten.....	1
1.1.1	Testosteron som doping .....	3
1.1.2	Steroidprofil .....	4
1.2	Biosyntese av steroider.....	8
1.2.1	Testosteron .....	10
1.2.2	Epitestosteron .....	10
1.2.3	Dihydrotestosteron .....	11
1.2.4	Dehydroepiandrosteron .....	11
1.2.5	17-oksosteroidene.....	11
1.2.6	Androstandiolene .....	12
1.3	Luteiniserende hormon .....	12
1.4	Legemidlene i studien.....	12
1.4.1	Testogel® .....	12
1.4.2	Testoviron® Depot.....	12
1.5	Analyse av endogene analytter .....	13
1.5.1	Internstandard.....	13
1.5.2	Hydrolyse .....	14
1.5.3	Væske-væske ekstraksjon .....	15
1.5.4	Derivatisering .....	15
1.5.5	Gasskromatografi .....	16
1.5.6	Massespektrometri .....	16
1.5.7	Isotop ratio massespektrometri.....	19
1.5.8	Fast-fase fluoroimmunoassay.....	21
1.6	Problemstilling.....	22
2	Materialer .....	23
2.1	Kjemikalier og utstyr .....	23
2.2	Løsninger .....	25
2.2.1	Bruksløsninger .....	25
2.2.2	Derivatiseringsløsninger.....	25
2.2.3	Kalibratorløsninger.....	26

## Innholdsfortegnelse

2.2.4	Internstandard til kvantifisering .....	26
3	Eksperimentelt.....	27
3.1	Studien .....	27
3.1.1	Forsøkspersoner .....	27
3.1.2	Gjennomføring av studien .....	27
3.2	Metode for analyse ved GC-MS .....	28
3.2.1	Validering .....	28
3.2.2	Forarbeid .....	28
3.2.3	Prøveopparbeidelse .....	29
3.2.4	Analyseparametre .....	31
3.2.5	Identifikasjon og kvantifisering .....	32
3.3	Metode for analyse ved IRMS .....	32
3.3.1	Instrument: GC-C-IRMS .....	33
3.4	Metode for fast-fase immunoassay LH-analyse .....	34
3.5	Metode for PCR-analyse .....	34
4	Resultater.....	35
4.1	Validering .....	35
4.2	Prøveresultater .....	36
4.2.1	Genotyping av deltagerne.....	36
4.2.2	GC-MS- analyse av analyttene.....	37
4.2.3	T/E-ratio .....	51
4.2.4	Ratio av utvalgte analytter.....	57
4.2.5	Analyse ved IRMS .....	58
4.2.6	Analyse av LH ved fluoroimmunoassay .....	61
5	Diskusjon.....	63
5.1	Prøveresultater .....	63
5.1.1	Konsentrasjon av analyttene.....	63
5.1.2	T/E-ratio .....	63
5.1.3	5 $\alpha$ -reduktaseaktivitet i huden .....	67
5.1.4	IRMS-resultater .....	68
5.1.5	LH-resultatene .....	68
5.2	Mulige feilkilder .....	69
5.3	Fremtidig bruk av individuelle steroidprofiler .....	70

## Innholdsfortegnelse

6	Konklusjon .....	73
	Litteraturliste .....	75
7	Appendiks.....	79
	Appendiks 1 – Tillaging av kalibratorløsninger.....	79
	Appendiks 2 – Informasjonsskjema for deltageren.....	81
	Appendiks 3 – Flytskjema for prøvetakingsperiode .....	84

# Forkortelser

5 $\alpha$ -diol	5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol
5 $\beta$ -diol	5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol
A	Androsteron
AAS	Anabole androgene steroider
ACTH	Adrenokortikotrofisk hormon
C	Konsentrasjon
cAMP	Syklisk adenosin monofosfat
CI	Kjemisk ionisasjon
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
EG	Epitestosteron glukuronid
EI	Elektronionisasjon
ERC	Endogenous reference compound (endogent referansestoff)
ES	Epitestosteron sulfat
Etio	Etiokolanolon
GC	Gasskromatografi
HCG	Humant choriongonadotropin
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (høytrykk væskekromatografi)
Inj	Injeksjon
IOC	International Olympic Committee (Internasjonale Olympiske Komitè)
IRMS	Isotop ratio massespektrometri
KTE	Kontrollprøve T/E
LH	Luteiniserende hormon
LLE	Liquid-liquid extraction (væske-væske ekstraksjon)
LOD	Limit of detection (deteksjonsgrense)
LOQ	Limit of quantification (kvantifiseringsgrense)
m/z	masse/ladning
mg	milligram
ml	milliliter
MS	Massespektrometri
MSTFA	N-metyl-N-trimetylsilyltrifluoracetamid

## Forkortelser

ng	nanogram
NLD	Norges laboratorium for dopinganalyse
OH	Hydroksy-
OL	De Olympiske Leker
PCR	Polymerase chain reaction (polymerase kjedereaksjon)
PD	Pregnandiol
SIM	Selective Ion Monitoring (selektiv ionemonitorering)
TBME	<i>tert</i> -butylmetyleter
T/E	Forholdet mellom konsentrasjonen av testosteron glukuronid (TG) og epitestosteron glukuronid (EG) i urin
TG	Testosteron glukuronid
TMS	Trimetylsilyl
UGT	Uridin difosfo (UDP)-glukuronosyl transferaser
v:w:v	vekt/volum/vekt
VPDB	Vienna Pee Dee Belemnite
WADA	World Anti-Doping Agency (Verdens antidopingbyrå)
µg	mikrogram
µl	mikroliter



# 1 Innledning

## 1.1 Doping i idretten

Doping er et gammelt fenomen som har lange tradisjoner, både i idretten og i samfunnet generelt. Kineserne brukte for 5000 år siden efedrin fra planteekstrakter for å styrke hjertet og øke blodtrykket [1]. I antikkens Hellas brukte atletene stimulerende styrkedrikk og spesielle dietter for å forbedre prestasjonene [2, 3], og allerede i de første moderne olympiske leker ble stimulerende midler som kokain, heroin, stryknin og morfin brukt for å bedre prestasjonsevnene, selv om de muligens gjorde mer skade enn nytte [4]. Begrepet doping stammer mest sannsynlig fra det nederlandske ordet ”dop” som betyr blanding. Dop var navnet på en drikk med innhold av blant annet alkohol og xantiner som Zulu-krigerne i Sør-Afrika drakk for å forbedre deres krigerske evner [1-3].

Under annen verdenskrig ble amfetamin brukt i utstrakt grad av soldatene for å unngå utmattelse. Dette stoffet beveget seg over til idretten i 1950-årene og kan sies å være det første ”effektive” dopingmiddelet [4]. Det antas at amfetamin ble brukt av skøyteløpere under de olympiske leker (OL) i Oslo i 1952 [1]. Bruken av dopingmidler akselererte utover 1900-tallet, spesielt etter at syntetiske hormoner i økende grad ble tatt i bruk innenfor idretten fra 1950-årene og utover [4]. To tragiske dødsfall i 1960-årene på grunn av amfetaminbruk; den danske syklisten Knud Enemark Jensen under OL i Roma i 1960 og syklisten Tom Simpson under Tour de France i 1967, satte søkelyset på behovet for antidoping arbeid [2, 3]. Som en følge av dette ble det for første gang introdusert dopingkontroller under vinter-OL i Grenoble og sommer-OL i Mexico i 1968 [2].

Den første pålitelige deteksjonsmetoden for å avsløre misbruk av steroider kom i 1974 og anabole steroider ble i 1976 satt på den Internasjonale Olympiske Komitès (IOC) liste over forbudte stoffer. Mot slutten av 1970-tallet begynte antidoping arbeidet både mot bruk av stimulerende midler og steroider å gi resultater, men en ny type doping ble introdusert. Injisering av eget eller fremmed blod før konkurranse for å øke andelen av hemoglobin i blodet ble tatt i bruk i 1970-årene, men bloddoping som metode ble ikke forbudt av IOC før i 1986. Bloddoping ble mye brukt i utholdenhetsidretter som sykling, langrenn og løping [2]. Kunstig erythropoietin (EPO), som opprinnelig ble utviklet av den farmasøytiske industri til behandling av alvorlig anemi, ble raskt tatt i bruk som dopingmiddel og ble satt på

## Innledning

dopinglisten i 1990. Tour de France i 1998 huskes i etterkant best fordi det under en politirazzia ble funnet store mengder EPO, veksthormoner, amfetamin og anabole steroider. Tour de France-skandalen satte søkelyset på behovet for en uavhengig internasjonal myndighet med ansvar for blant annet koordinering av antidoping arbeid og standardisering av dopingtester, noe som resulterte i opprettelsen av World Anti-Doping Agency (WADA) i 1999 [1, 2].

Dopingbegrepet benyttes om all form for tilføring av endogene og eksogene stoffer for å øke prestasjonsnivået på en unormal eller uetisk måte [3]. Innenfor idretten i dag defineres følgende som doping:

- Tilstedeværelse av forbudt stoff i dopingprøve
- Bruk av stoffer og metoder på dopinglista
- Unnlate å møte til kontroll
- Bryte krav til utøverinformasjon/tilgjengelighet
- Forfalske, forbytte eller ødelegge dopingprøve
- Besitte stoff eller metode forbudt på dopinglista
- Tilvirke, innføre, utføre, selge, distribuere, erverve, sende eller overdra stoffer eller metoder på dopinglista
- Forskrive eller gi et forbudt stoff eller metode

Det er WADA som definerer og oppdaterer hvilke stoffer og metoder som omfattes av antidoping-lovgivningen, mest kjent som dopinglisten [5]. Dopinglisten oppdateres hvert år, og omfatter både ulovlige stoffer og ulovlige metoder både i og utenfor konkurranse. Forbudte stoffer deles i anabole stoffer, peptidhormoner, vekstfaktorer og andre relaterte substanser, beta-2-agonister, hormon- og metabolske modulatorer, diuretika og andre maskeringsmidler, i tillegg til en generell gruppe av ikke godkjente stoffer som skal favne substanser som ikke omfattes av de øvrige fem gruppene [6]. For at et stoff eller metode kan inkluderes på dopinglisten må minst to av følgende kriterier være tilstede:



## Innledning

- Stoffer eller metoder som har potensiale til å forbedre prestasjoner
- Utgjør en helserisiko for utøver
- Utgjør brudd på idrettens anseelse [5]

### 1.1.1 Testosteron som doping

Testosteron ble identifisert som det primære mannlige kjønnshormon (androgen) i midten av 1930-årene. Det ble isolert og syntetisert for første gang i 1935 av Ruckzika og Butenandt, og har vært i bruk klinisk i over syv tiår [7], primært som androgen erstatningsterapi til menn med mangelfull egenproduksjon av androgener. Testosteron kan dermed sies å være blant de eldste legemidlene som fortsatt markedsføres, med lang erfaring og status som sikker og effektiv, når benyttet til riktige medisinske indikasjoner [8]. I idrettssammenheng kjenner man til bruk av testosteron etter OL i 1948, men det er først i 50-60-årene at bruken økte i omfang og markerte ”viriliseringen” av moderne sport [4]. Steroidene ble i hovedsak benyttet innenfor friidrett og andre styrkekrevede idretter [1]. Den mest famøse epoken i OLs dopinghistorie var bruken av androgene anabole steroider (AAS) blant utøvere tilhørende daværende DDR, eller Øst-Tyskland, på 60-, 70- og 80-tallet. Hemmeligstemplede dokumenter har i etterkant vist at det ble drevet statskontrollert doping, noe som inkluderte hundrevis av leger og forskere som fungerte som uoffisielle samarbeidspartnere til det statlige ”ministeriet for statssikkerhet”, Stasi. Flere tusen utøvere ble behandlet med androgener hvert år, inkludert mindreårige av begge kjønn. Administrering av androgener til kvinner og unge jenter fikk særskilt fokus, da dette viste å ha spesielt stor effekt på sportslige prestasjoner [9]. I de senere tiårene har testosteron og andre androgener i økende grad blitt misbrukt i forbindelse med kroppsbygging og økning av fysisk prestasjonsevne [8].

Mange mente at testosterons prestasjonsfremmende effekt kunne tilskrives androgeners påvirkning på motivasjon og aggresjon, i tillegg til at muskelmassen og muskelstyrken øker [10]. Studier på kastrerte dyr og hypogonadale menn har demonstrert dette, men den vitenskapelige dokumentasjonen på om dette også gjelder normale menn har lenge vært mangelfull. Studiene har ofte vært små og dosene til forsøkspersonene har av etiske grunner vært langt mindre enn dopingdosene. Kontrollgruppe og standardisering av energiinntak og fysisk aktivitet har også ofte vært fraværende [3]. I 1996 ble det endelig bekreftet med en studie av Bhasin *et al.* at administrasjon av suprafysiologiske testosterondoser til normale

## Innledning

menn gir prestasjonsfremmende effekter i form av økt andel fettfri masse, økt muskelstørrelse og styrke [11]. Senere er det vist at vektløftere med pågående eller tidligere misbruk av anabole steroider oppnådde økt tverrsnitt av muskelfibrene og antall kjerner per fiber, sammenlignet med vektløftere som ikke var eksponert for anabole steroider. Tidligere bruk av anabole steroider kan muligens forbedre fysisk prestasjonsevne i mange år etter avsluttet inntak [12].

WADA utarbeider retningslinjer for internasjonale dopingtester, som blant annet skal forhindre og avdekke misbruk av AAS. I 2004 var de hyppigst oppdagede stoffene androgener, hvorav de tre substansene testosteron, nandrolon og stanozolol stod for ca 80 % av de positive resultatene [8]. WADA rapporterer for 2010 at 60,8 % av funn som krever videre oppfølging, kan tilskrives AAS [13]. Til tross for årelang erfaring og kunnskap, er deteksjon av doping med testosteron eller testosteron prohormoner fremdeles en utfordrende problemstilling innen idretten [14].

### 1.1.2 Steroidprofil

Under OL i Moskva i 1980 var det mistanke om stort misbruk av testosteron blant utøverne. På den tiden hadde de analytiske metodene for deteksjon av syntetiske AAS blitt såpass gode at utøvere satset på endogene steroider som testosteron. Kvantifisering av testosteron, som metode for å avdekke misbruk, var lite tilfredsstillende på grunn av høy metabolsk omsetning, døgnvariasjon av testosteronutskillelse og ikke minst en stor inter-individuell variabilitet. Behovet for en metode som kunne detektere bruk av testosteron var opphavet til bruken av steroidprofil i dopingsammenheng. Med steroidprofil menes konsentrasjon og ratio i urin av forskjellige endogene steroidhormoner, deres forløpere og metabolitter. Dette inkluderer testosteron, epitestosteron, dihydrotestosteron (DHT), androsteron, etiokolanolon, dehydroepiandrosteron (DHEA), 5 $\alpha$ -diol og 5 $\beta$ -diol [15]. Figur 1 viser relasjonen mellom disse steroidene.

I første halvdel av 90-tallet demonstrerte flere studier at de intra-individuelle variasjonene, det vil si variasjoner for et individ, i steroidprofilparametere var små i forhold til inter-individuelle variasjoner, det vil si variasjoner mellom individer. Dette gjaldt ratio som testosteron/epitestosteron (T/E), androsteron/etiokolanolon (A/Etio), androsteron/testosteron (A/T), og 5 $\alpha$ -diol/5 $\beta$ -diol. Disse ratioene ble ikke påvirket av fysisk aktivitet, stor utholdenhetsbelastning, menstruasjonssyklus eller biologisk døgnrytme [15]. Endringer i

## Innledning

konsentrasjon for en eller flere av disse parametrene interfererer med det naturlig velbalanserte systemet og kan derfor gi grunn til dopingmistanke ved rutinekontroller, enten ved økte eller reduserte konsentrasjoner og ratio. Ved opprettelse av longitudinale profiler som baseres på en utøvers prøver som er tatt over et lengre tidsperspektiv, kan et stabilt ”vindu” etableres. Unormale verdier kan dermed detekteres, noe som gjør steroidprofiler verdifulle i arbeidet med å fange opp mistenkelige prøver.

Steroidprofiler, som i dag bestemmes rutinemessig i dopingkontroller, gir essensiell informasjon for flere formål. Dersom den kvantitative variasjonen innad og mellom ulike laboratorier er for høy, vil imidlertid informasjonen være lite verdifull. I en studie fra 1996 som undersøkte inter- og intra-laboratoriske variasjoner analyserte seks internasjonale laboratorier de samme fire urinprøvene i triplikat. Studien viste at den intra-laboratoriske variasjonen var mindre enn den inter-laboratoriske, og at analyseresultatene for ulike parametre varierte signifikant mellom laboratoriene [16]. Det er svært viktig at analyseresultatene fra de ulike WADA-akkrediterte laboratoriene er sammenlignbare, slik at man kan korrelere prøver fra en utøver analysert i ulike laboratorier. Dette sikres ved at laboratoriene må gjennom omfattende valideringer, kompetansetester og reakkrediteres årlig [15].

### T/E-ratio

Som en indikator på testosteronmisbruk, introduserte Donike *et al.* [17] i 1982 bruken av T/E-ratio, det vil si forholdet mellom konsentrasjonen av testosteron glukuronid (TG) og epitestosteron glukuronid (EG) i urin. De demonstrerte at utskillelsen av TG øker mer enn utskillelsen av andre testosteronmetabolitter, etter administrasjon av testosteron både oralt og intramuskulært [17, 18]. Det ble vist at utskillelsen av epitestosteron i urin er relativt konstant, noe som dermed kompenserer for variasjonen i testosteronkonsentrasjon som forekommer avhengig av hvor fortynnet urinen er. Den konstante utskillelsen av epitestosteron fører til at det vanligvis stabile forholdstallet mellom testosteron og epitestosteron øker ved tilførsel av testosteron [19]. T/E-verdiene som Donike fant i sine studier varierte fra person til person, men de vanligste verdiene lå rundt 1-2, og den øvre grensen lå under 6.

På bakgrunn av disse dataene ble bruk av testosteron innen idretten forbudt av IOC i 1982, og man regnet T/E-verdier over 6 som tilstrekkelig bevis for misbruk av testosteron [18]. Det oppstod imidlertid tilfeller med naturlig høy T/E ratio over 6 [20]. Dehennin og Scholler

estimerte forekomsten av naturlig forhøyet T/E-ratio over 6, til 15:10000, i en gruppe av idrettsutøvere i tenårene [21]. IOC endret regelen til at T/E verdier over 6 skulle anses som mistenkelig og kreve videre oppfølgingsundersøkelser. For å øke sensitiviteten ble grensen endret av WADA i 2004. Dagens reaksjonsgrense er T/E-ratio over 4 [22]. Oppfølgingsundersøkelsene skal avdekke muligheten for naturlig forhøyet T/E-ratio på grunn av fysiologiske eller patologiske årsaker. Funnene kan sammenlignes med tidligere tester, endokrinologiske undersøkelser eller uannonserte tester over flere måneder [22]. Målet med å samle mange tester er å etablere et individuelt referanseområde for en utøver, avhengig av den intra-individuelle T/E-variasjonen [18]. En enkelt måling gir ikke grunnlag for å rapportere et brudd på dopingreglementet. Etter dagens regelverk må funnet bekreftes med en analyseteknikk som kan skille mellom tilført testosteron og endogent testosteron (omtales i avsnitt 1.5.7).

Siden introduksjonen av T/E-ratio har flere kritikere pekt på saker der måling av denne parameteren har sådd tvil om sannsynligheten for å unngå falske negative og falske positive resultater. Hos mannlige idrettsutøvere har man ment at individuelle T/E-verdier varierer med mindre enn 30 % i forhold til gjennomsnittsverdien [14]. Det er imidlertid senere beskrevet i litteraturen at individer i noen tilfeller kan ha større intra-individuelle variasjoner enn dette [19]. Til tross for denne kritikken, har måling av T/E-forholdet vært, og er fortsatt, den hyppigst brukte metoden for å detektere mistenkelige prøver.

### **Faktorer som kan påvirke steroidprofil**

Langvarig og retrospektiv vurdering av en utøvers dopingprøver med hensyn på steroidprofiler gjør det mulig å detektere unormale forandringer i verdiene. Dette kan føre til oppfølgingsundersøkelser, som for eksempel bekreftende analyse ved GC/C/IRMS [15]. Nytteverdien av informasjon fra steroidprofiler i urin er stor, og kan være et viktig bidrag til suksessfull screening av anabole steroider. Det er kjent at flere faktorer kan påvirke steroidprofil [15, 18], og det er derfor svært viktig å ha oversikt over ulike faktorer som kan ha innflytelse på steroidprofilmønsteret. Ved siden av spesifikk vekt, pH-verdi, kjønn, sportsgren og tid for prøvetaking, må farmasøytiske, tekniske og biologiske faktorer tas i betraktning ved tolking av steroidprofiler. Det er vist at blant annet inntak av ulike legemidler, samt alkohol, kan påvirke utskillelsen av steroider [15]. De senere årene har genetikk fått stadig mer oppmerksomhet som påvirkende faktor på steroidprofil.

### Genetisk variasjon

De tidligste studiene som undersøkte T/E-ratio ble gjort på kaukasiske menn og kvinner, og viste at gjennomsnittet lå mellom 1-2. Verdiene til forsøkspersonene hadde en normalfordeling, der den øvre grensen lå under 6 [18]. Senere studier har demonstrert at mange individer, spesielt en stor andel asiater, viser signifikant lavere T/E-ratio enn dagens reaksjonsgrense på 4, noe som dermed gir en mulighet for falske negative prøver [23]. Dette kan forklares ved at det foreligger en genetisk variasjon i ett enzym relatert til metabolisme av androgener [24].

Testosteron utskilles hovedsaklig som glukuronidkonjugater. Metabolismen skjer ved hjelp av uridin difosfo (UDP)-glukuronosyl transferaser (UGT), som har en nøkkelrolle i homeostasen til en rekke endogene molekyler, inkludert steroidhormoner [25]. Tre medlemmer av denne familien, UGT2B7, UGT2B15 og UGT2B17, er de prinsipielle katalysatorene til glukuronideringen av androgener og deres metabolitter. UGT2B15 og UGT2B17 viser 96 % likhet i gensekvens, men en bredere substratspesifisitet gjør at UGT2B17 er spesielt sentral i glukuronidering av testosteron [24, 26]. Ved hjelp av genanalyser ble det funnet at UGT2B17 er fraværende i enkelte humane DNA-prøver. Det ble konkludert med at UGT2B17 er tilstede i det humane genomet som en delesjonspolymorfisme, linket til UGT2B15 [27] og at denne delesjonspolymorfismen er sterkt assosiert med nivået av TG urin [28].

Polymorfisme innebærer at to eller flere alleler av det bestemte genet forekommer med en viss hyppighet i en populasjon [29]. UGT2B17 kan forekomme i tre ulike varianter, genotyper, avhengig av allelkombinasjon; *ins/ins*, *ins/del* og *del/del*. Sistnevnte med delesjon i begge gen er den minst vanlige blant kaukasiere. Det er fastslått at *del/del* genotypen forekommer mye oftere hos asiater enn kaukasiere [28, 30]. Det ble i en svensk studie fra 2006 påvist at 66,7 % av asiatiske studiedeltagere (koreanere) hadde denne genotypen, mot 9,3 % av deltagerne med kaukasiske opprinnelse (svensker). Det ble demonstrert store variasjoner i distribusjonen av testosteronutskillelsen mellom gruppene, og medianverdien i den svenske populasjonen var 16 ganger høyere enn i den koreanske populasjonen [28]. Resultatene i denne studien er i samsvar med referanseverdier for kaukasiske og asiatiske mannlige og kvinnelige idrettsutøvere utregnet fra databaser for asiatiske mesterskap på 1990-tallet og fra rutinemessige dopingkontroller av kaukasiske menn i Köln i 1994, i tillegg til populasjonsbaserte referanseverdier fra nærmere 7000 idrettsutøvere [15]. I 2009 publiserte Juul *et al.* en studie som undersøkte betydningen av UGT2B17 på utskillelsen av androgene

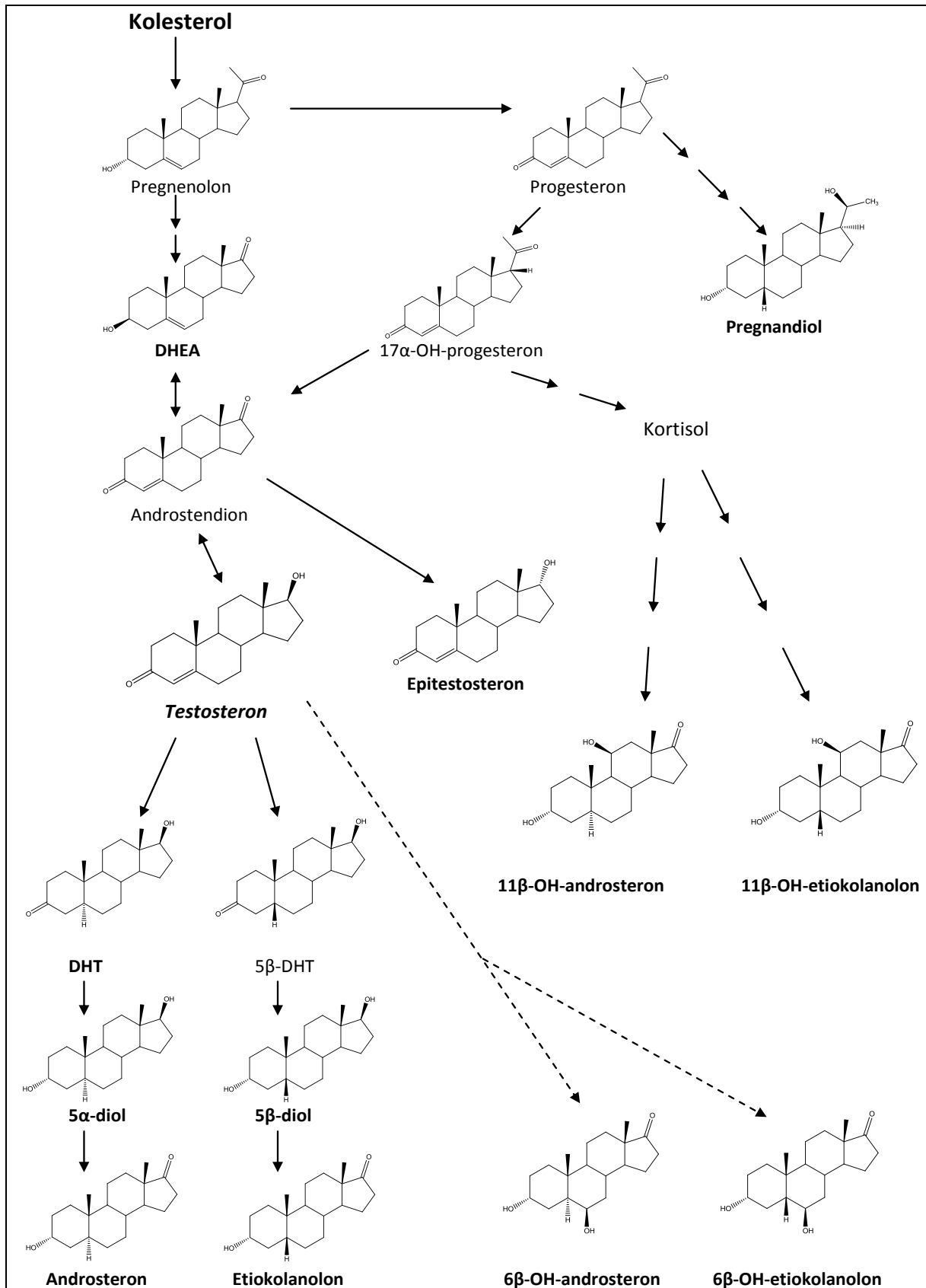
metabolitter hos gutter i puberteten. Av 116 kaukasiske gutter som deltok i studien hadde 10 individer (9 %) en homozygot delesjon i UGT2B17-genet [30], noe som videre bekrefter en forekomst på rundt 10 % av *del/del*-genotypen blant kaukasiere.

## 1.2 Biosyntese av steroider

Endogene steroider blir syntetisert gonadene og i binyrebarken hos både kvinner og menn, med kolesterol som utgangspunkt. Enzymsystemer, som blant annet CYP-450-enzym, inngår i syntetiseringen av steroidhormonene. Enzymaktiviteten varierer fra person til person, slik at typen og mengden steroidhormoner som blir produsert kan være forskjellig. Grad av utskillelse avhenger også av kjønn og alder [31].

Det finnes svært mange endogene steroidhormoner. Synteseveiene til de ulike steroidene er ofte komplekse og ikke fullstendig klarlagt, da mange steroider kan ha flere forløpere. I den senere tid har fokuset innen dopinganalyse økt på de mindre metabolske veiene som leder til oksygenerte og hydroksylerte metabolitter [32]. Det kan tenkes at de viktigste metabolismeveiene ”mettes” etter applikasjon av endogene steroider og dermed øker dannelsen av de mindre metabolittene [33]. Denne hypotesen gjør det viktig å klargjøre de mindre metabolismeveiene og ha oversikt også over disse metabolittene. WADA’s tekniske dokument for endogene steroider inkluderer noen av disse metabolittene [22]. Figur 1 viser en forenklet skisse over sentrale endogene steroider og deres metabolisme.

## Innledning



Figur 1 – Forenklet skisse over biosyntese av utvalgte steroider. Nederst til venstre ses seks hovedmetabolitter av testosteron (major metabolites). 6 $\beta$ -OH-androsteron og 6 $\beta$ -OH-etikolanolon er minor metabolitter.

### 1.2.1 Testosteron

Testosteron ( $17\beta$ -OH-androst-4-en-3-on) er det dominerende androgenet hos menn, og utgjør forskjellige funksjoner i de ulike stadiene av livet. I embryofasen er den androgene virkningen sentral i utviklingen av den mannlige fenotypen. I puberteten øker produksjonen, og testosteron er ansvarlig for de sekundære kjønnskarakteristika som forandrer gutter til menn, som for eksempel senkning i stemmeleie og økt muskelmasse. Testosteron regulerer i tillegg mange fysiologiske prosesser hos mannen, inkludert muskel-proteinmetabolisme, seksuelle og kognitive funksjoner, erytropoiese, plasmalipidnivåer og benregulering [34].

Testosteronproduksjonen hos menn foregår hovedsaklig i Leydigcellene i testiklene og reguleres av luteiniserende hormon (LH). Hypofysen skiller ut LH, som stimulerer testosteronsyntesen ved å binde seg til overflatereseptorer på Leydigcellene. Bindingen fører til aktivering av en cAMP-mekanisme som øker omdanningen av kolesterol videre til pregnenolon. Mengde testosteron som syntetiseres hvert døgn hos unge menn med normal produksjon er mellom 5 og 7 mg [35]. Maksimum konsentrasjon i serum observeres på morgenen rundt kl.08.00, mens laveste konsentrasjon kan ses tidlig på kvelden [36].

Testosteron binder seg til androgenreseptorer, som kodes av et gen som sitter på X-kromosomet. Selv om det kun finnes en type androgenreseptor kan testosteron ha ulik virkning i ulike vev på grunn av kofaktorer og koenzymmer. Vev som uttrykker enzymet  $5\alpha$ -reduktase vil konvertere testosteron til DHT, mens vev med aromataseaktivitet vil omdanne testosteron til østradiol. [35]

### 1.2.2 Epitestosteron

Epitestosteron ( $17\alpha$ -OH-androst-4-en-3-on) er  $17\alpha$ -isomeren til testosteron og utskilles i samme konsentrasjonsområde som testosteron. Til tross for at epitestosteron har svært liten androgen effekt er den likevel en sentral substans i dopingsammenheng på grunn av bruken av T/E-ratio som deteksjonsmetode for ulovlig testosterontilførsel. Epitestosteron kan maskere inntak av testosteron, og er på grunn av dette oppført på dopinglisten [5]. Mindre enn 1 % av epitestosteron stammer fra testosteron, og substansen regnes ikke som en av testosteronmetabolittene. Rundt halvparten av total epitestosteronproduksjon er av testikulært opphav, den resterende andelen er mer uviss [18, 37].



### 1.2.3 Dihydrotestosteron

Dihydrotestosteron ( $17\beta$ -OH- $5\alpha$ -androstan-3-on), eller DHT, er en metabolitt av testosteron, og dannes via omdanning med enzymet  $5\alpha$ - reduktase. DHT er mer potent enn testosteron på grunn av større affinitet til androgenreseptorene, men beskjeden anabol effekt gjør at den er av relativ liten interesse blant dopingmisbrukere [38].

### 1.2.4 Dehydroepiandrosteron

Dehydroepiandrosteron ( $3\beta$ -OH-androst-5-en-17-on), også kalt DHEA, er en forløper til testosteron. DHEA blir hovedsaklig produsert i binyrebarken, men også i gonadene og i perifere vev. DHEA utøver liten androgen effekt, men økte nivåer kan føre til økt produksjon av testosteron. Av total mengde DHEA blir omlag 1 % omgjort til testosteron. Glukuronidfraksjonen av DHEA er langt mindre enn den sulfaterte fraksjonen [39].

### 1.2.5 17-oksosteroidene

Androsteron ( $3\beta$ -OH- $5\alpha$ -androstan-17-on) og etiokolanolon ( $3\alpha$ -OH- $5\beta$ -androstan-17-on) er hovedmetabolittene til DHEA, androstendion og testosteron. Over 90 % skilles ut i urinen. Disse kjennetegnes, som navnet tilsier, ved at de har en oksogruppe på C-17.

Blant 17-oksosteroidene finnes også følgende steroider:

- $6\beta$ -OH-androsteron ( $3\alpha,6\beta$ -OH- $5\alpha$ -androstan-17-on)
- $6\beta$ -OH-etikolanolon ( $3\alpha,6\beta$ -OH- $5\beta$ -androstan-17-on)
- $11\beta$ -OH-androsteron ( $3\alpha,11\beta$ -OH- $5\alpha$ -androstan-17-on)
- $11\beta$ -OH-etikolanolon ( $3\alpha,11\beta$ -OH- $5\beta$ -androstan-17-on)

Totalt utgjør andelen 17-oksosteroider omtrent halvparten av steroidene som skilles ut i urin. Disse stoffene har blitt foreslått som markører for å avdekke misbruk av androstendion [22]. Av Figur 1 påvirkes  $6\beta$ -OH-steroidene lite av testosterontilførsel da de er minor metabolitter og dannes i små mengder.  $11\beta$ -OH-steroidene i teorien er ikke testosteronmetabolitter og skal i prinsippet ikke påvirkes av eksogent testosteron.

### 1.2.6 Androstandiolene

Androstandiolene ( $5\alpha$ -/ $5\beta$ -androstan- $3\alpha$ , $17\beta$ -diol) utgjør to isomere,  $5\alpha$ - og  $5\beta$ - androstandiol ( $5\alpha$ - diol og  $5\beta$ -diol). Disse isomerene utgjør kun rundt 4 % av totale testosteronmetabolitter, men er likevel strukturelt sett nært relatert til testosteron. Misbruk av testosteron og androstendion vil føre til økt mengde av  $5\alpha$ -diol og  $5\beta$ -diol.

## 1.3 Luteiniserende hormon

Luteiniserende hormon (LH) er et gonadotropin som skilles naturlig ut fra hypofysen. Hos menn vil LH stimulere til økt testosteronproduksjon i Leydigcellene og står oppført på dopinglisten [6]. Tilføring av testosteron undertrykker gonadotropinutskillelsen fra hypofysen [18]. Forholdet mellom testosteron og LH (T/LH) kan brukes til å frembringe ekstra informasjon som kan avdekke bruk av enkelte substanser, spesielt injisert testosteron og mange testosteron estere. En høy T/LH-ratio kan brukes som støttende bevis i eventuelle dopingsaker. Imidlertid er det viktig å være klar over at administrering av testosteron eller dets forløpere, DHEA og androstendion, ikke alltid vil gi utslag på LH- ekskresjon [22].

## 1.4 Legemidlene i studien

### 1.4.1 Testogel®

Testogel har markedsføringstillatelse i Norge med indikasjon som substitusjonsbehandling ved mannlig hypogonadisme når testosteronmangel er bekreftet ved kliniske og laboratoriemessige funn. Anbefalt dosering er 5 g gel, tilsvarende 50 mg testosteron, en gang daglig. Gelen administreres percutant (på hud) der den absorberes og diffunderer i den systemiske sirkulasjonen i løpet av 24 timer. Gelen skal påføres på ren, tørr og frisk hud enten på skuldre, armer eller abdomen. Deretter bør en vente i minst 3-5 minutter før påkledning. Ved behandlingsstopp vil konsentrasjonen begynne å falle etter omtrent 24 timer, og vil normaliseres etter 72 til 96 timer [40].

### 1.4.2 Testoviron® Depot

Testoviron Depot er ikke lenger markedsført i Norge, men er tilgjengelig blant annet i Danmark og andre europeiske land. Indikasjonen er mannlig hypogonadisme, og anbefalt

dosering er 250 mg hver 3-4 uke. Legemiddelet inneholder testosteron enantat i depotformulering som langsomt fraspalter fritt testosteron etter intramuskulær injeksjon. Virkningen opprettholdes i 2-3 uker [41].

## 1.5 Analyse av endogene analytter

Blod og urin er to biologiske matrikser som er mye brukt i forbindelse med biologiske analyser. Det er matrikser som forholdsvis enkelt lar seg donere, samt at de kan benyttes til å si noe om biologisk forekomst av stoffer. Urin og serum inneholder begge biomarkører fra kroppen og vil derfor fungere som speiling av hva som har vært i kroppen. Deteksjon av en analytt eller metabolitten av denne fra serum eller urin kan derfor være et godt bevis på at analytten har vært i kroppen.

Urin dannes ved filtrering av blod gjennom nyrene og består av 95 % vann og avfallsprodukter som urea, kreatinin og salter [42]. Urin er generelt fritt for proteiner og lipider og kan derfor normalt ekstraheres direkte med en organisk solvent [43]. Før kromatografi kreves det i mange tilfeller tilstrekkelig prøveoppbehandling av flere årsaker:

- Urinen kan inneholde stoffer som kan ødelegge analyseinstrumentet.
- Urinen kan inneholde en eller flere forurensninger som interfererer med responsen fra analytten.
- Konsentrasjonen av analytten kan være så lav at den krever oppkonsentrering for å kunne detekteres.

Det finnes flere tilnærminger til hvordan slike prøver opparbeides for å kunne analyseres. Analyttens egenskaper, prøvens sammensetning og konsentrasjon av analytt i prøven bestemmer hvilken strategi som bør benyttes [44]. Prøveoppbehandling som blir gjort i denne oppgaven baseres på prinsippet om å isolere de aktuelle analyttene ved hjelp av væske-væske ekstraksjon (omtales i avsnitt 1.5.3).

### 1.5.1 Internstandard

Analyse av biologisk materiale som blod- og urinprøver krever prøveoppbehandling som går over flere trinn. For å korrigere for tilfeldige endringer som skjer under prøveoppbehandling

## Innledning

benyttes det en intern standard (IS). IS er et stoff som tilsettes prøven i kjent konsentrasjon før prøveoppbeidelsen starter, og som oppfører seg på samme måte som stoffet som skal bestemmes under prøveoppbeidelsen. Stoffet som brukes som IS må ikke være tilstede i prøven og bør tilsettes i en konsentrasjon som gir topphøyde eller areal lignende analytten [45]

I forsøket ble det brukt deutererte internstandarder for analyttene der dette var tilgjengelig. For de analyttene der deuterert internstandard ikke var kommersielt tilgjengelig, ble det valgt den internstandard som oppførte seg mest mulig likt. For oversikt over interstandardene som ble brukt til de ulike analyttene, se Tabell 1.

**Tabell 1 – Analytt og tilhørende internstandard**

<b>Analytt</b>	<b>Internstandard</b>
Testosteron	d <sub>3</sub> -testosteron
Epitestosteron	d <sub>3</sub> -epitestosteron
5 $\alpha$ -androstandiol	d <sub>3</sub> -5 $\alpha$ -androstandiol
5 $\beta$ -androstandiol	d <sub>5</sub> -5 $\beta$ -androstandiol
6 $\beta$ -OH-androsteron	d <sub>3</sub> -testosteron
6 $\beta$ -OH-etiokolanolon	d <sub>3</sub> -testosteron
11 $\beta$ -OH-androsteron	d <sub>3</sub> -testosteron
11 $\beta$ -OH-etiokolanolon	d <sub>3</sub> -testosteron
Androsteron	d <sub>5</sub> -etiokolanolon
Etiokolanolon	d <sub>5</sub> -etiokolanolon
DHT	d <sub>3</sub> -testosteron
DHEA	d <sub>3</sub> -epitestosteron
Pregnandiol	Metyltestosteron

### 1.5.2 Hydrolyse

Under fase 2-metabolisme blir testosteron og andre endogene steroider konjugert, blant annet med glukuronsyre. Dette gjør steroidene mer polare, og dermed vannløselige slik at de kan skilles ut i urinen. Ved dopinganalyse av steroider er det glukuronidfraksjonen av steroidene det analyseres på. For den videre prøveoppbeidelsen og analyse er det nødvendig å spalte av glukuronsyrekonjugatene. I denne oppgaven er det brukt enzymatisk hydrolyse ved å tilsette

enzymet  $\beta$ -glukuronidase, som kommer fra bakterien *E.coli*. Etter hydrolysen er steroidene dekonjugerte. Med hensyn på testosteron og epitestosteron, vil det også være noe ukonjugert som skilles ut i urin. Denne mengden er imidlertid under 1 % av det som totalt blir utskilt i urinen, og vil ikke føre til en signifikant endring i T/E-ratio [18].

Tiden som trengs for fullstendig hydrolyse av glukuronsyrekonjugatene varierer mellom de forskjellige steroidglukuronidene. Testosteronglukuronid spaltes etter kort tid, mens for eksempel androsteron- og etiokolanolon-glukuronid krever lengre hydrolysetid. Dette skyldes antagelig ulik reaksjonstid på enzymaktivitet, da steroidene er konjugert på forskjellige posisjoner. I tillegg viser androsteron og etiokolanolon en høyere konsentrasjon i urin [15]. For å ha kontroll på hvor fullstendig hydrolysen er, kan forholdet mellom deuterert androsteronglukuronid og ukonjugert internstandard av etiokolanolon undersøkes [46]. For metoden brukt i denne oppgaven ville et forhold mindre enn 0.2 være et tegn på at hydrolysen ikke har vært fullstendig [47].

### 1.5.3 Væske-væske ekstraksjon

Prinsippet bak væske-væske ekstraksjon (LLE) baseres på egenskapen analytter har til å fordele seg mellom to ikke-blandbare væsker. Den ene væsken er en vandig løsning og den andre væsken er et organisk løsemiddel. Det organiske løsemiddelet er et godt løsemiddel for stoffet og et dårlig løsemiddel for forurensninger i prøven. Slik kan LLE brukes for å isolere og oppkonsentrere steroider fra biologisk materiale som urin.

For å få et best mulig ekstraksjonsutbytte er man generelt avhengig av en høy fordelingskoeffisient og rett pH i vannfasen i forhold til stoffenes  $pK_a$ -verdi [48]. Steroidene som analyseres i denne studien er imidlertid lite pH-følsomme. Ved ekstraksjon av steroider er blant annet *tert*-butylmetyleter (TBME) og pentan egnet som organiske faser. Begge er upolare og vil trekke de upolare steroidene over i organisk fase. Pentan vil være det optimale løsningsmiddelet for mange steroider, men på grunn av faren for redusert ekstraksjon av de mer polare steroidene, ble TBME valgt løsningsmiddel for denne oppgaven.

### 1.5.4 Derivatisering

Steroider har ofte polare funksjonelle grupper som for eksempel hydroksylgrupper. De polare gruppene reduserer stoffenes flyktighet. Samtidig forårsaker de adsorpsjon til

kolonnemateriale, som fører til at stoffene elueres som brede topper med haledannelse. Ved å derivatisere stoffene vil de polare gruppene omdannes til upolare grupper. Analyttene blir flyktige og termisk stabile derivater som egner seg bedre for gasskromatografi [49].

I prøveopparbeidelsen benyttes N-metyl-N-trimetylsilylfluoracetamid (MSTFA) som er tilsatt  $\text{NH}_4\text{I}$  og etantio. MSTFA er et egnet derivatiseringsreagens for stoffer med OH-grupper. Aktive H-atomer i OH-gruppene erstattes av trimetylsilylgrupper fra MSTFA. Ved å tilsette  $\text{NH}_4\text{I}$  og etantio vil også okso-grupper silyleres.

Dårlig derivatisering kan skyldes vann i prøven under derivatiseringen, eller et medikament i urinen som forbruker derivatiseringsreagens [47].

### 1.5.5 Gasskromatografi

Gasskromatografi (GC) er en velkjent separasjonsteknikk som benyttes for å analysere gasser eller flyktige stoffer i gassform. Teknikken er mye brukt til blant annet screening etter ukjente forbindelser i doping- og rettstoksikologiske analyser. Analytter som ikke er flyktige nok må derivatiseres før de kan injiseres i GC'en. Mobilfasen i GC kalles bæregass, og er en inert gass som strømmer gjennom en oppvarmet kolonne. Det benyttes enten en kapillærkolonne dekket med en stasjonærfase på innsiden eller en pakket kolonne fylt med partikler dekket av stasjonærfase på overflaten. Ved inngangen til kolonnen blir stoffene injisert i en oppvarmet injektor, der de fordampes til ulike tidspunkt avhengig av kokepunkt, og dermed separeres. For å unngå brede topper og dårlig separasjon er det viktig at injektortemperaturen er så høy at stoffene fordampes raskt. Etter fordampning fraktes bæregassen stoffene gjennom kolonnen. Stoffene fordeler seg ulikt mellom stasjonærfasen og bæregassen, noe som gjør at retensjonstiden varierer avhengig av temperaturen og hvor løselige de ulike stoffene er i stasjonærfasen. Temperaturen er den viktigste parameteren for retensjonstid i GC, da økt temperatur gjør stoffene mer flyktige og dermed reduserer retensjonstiden.

Det finnes mange ulike detektorer som kan benyttes i GC. Innen dopinganalyse er massespektrometer mest brukt, og analysemetoden kalles da GC-MS [49].

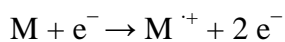
### 1.5.6 Massespektrometri

Massespektrometri (MS) er en viktig analyseteknikk som brukes i mange sammenhenger, blant annet i forbindelse med analyse av legemidler og tilhørende metabolitter i biologiske

## Innledning

prøver. MS blir ofte kombinert med GC (GC-MS) eller med væskekromatografi (LC-MS). For å utføre MS trengs det et avansert instrument som kalles et massespektrometer. MS kan brukes både til kvantitative bestemmelser og til identifikasjon av stoffer. Et massespektrum er svært karakteristisk og kan kalles stoffenes fingeravtrykk, noe som gjør at GC-MS er en standardmetode i dopinganalyse [49]. Alle forskjellige stoffer har ulike massespektre. Dette betyr at ukjente forbindelser kan identifiseres ved hjelp av stoffets massespektrum dersom dette stemmer overens med massespektret til en kjent forbindelse [50].

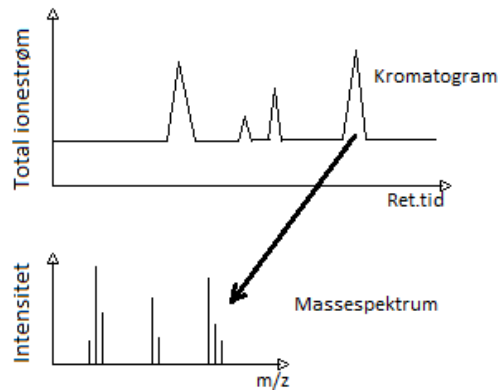
Ved bruk av GC-MS blir stoffene først separert ved passasje gjennom en kromatografisk kolonne, før stoffene ioniseres ved hjelp av en ionekilde inne i massespektrometeret. Det finnes ulike ioniseringsteknikker. I denne oppgaven blir analytten ionisert ved elektronionisasjon (EI), som er den vanligste teknikken for GC-MS. Ioniseringen foregår da under vakuum der analytten (i gassfase) føres inn i en stråle med elektroner som kommer fra en liten tråd (filament) av rhenium eller wolfram. I noen tilfeller vil det, som følge av elektrisk frastøtning, rives løs et elektron i molekylet når analytten føres inn i elektronstrålen og det dannes  $M^+$ , molekylion. Fordi det ble fjernet et elektron under ioniseringen er molekylionet positivt ladet. Molekylionet markeres også med en dott for å markere at det er et radikalion, det vil si at det har et uparret elektron:



Da de fleste molekylionene dannet ved EI er relativt ustabile vil de fleste molekylionene raskt fragmentere til fragmentioner. Massen til molekylionene og eventuelle fragmentioner bestemmes ved at ionene akselereres ut av ionekilden og inn i en masseanalysator, hvor de separeres etter masse/ladningsforhold ( $m/z$ ) ved hjelp av et magnetisk eller elektrostatisk felt. Instrumentet som brukes i denne oppgaven, er konstruert etter kvadrupolprinsippet. Kvadrupolen består av fire parallelle staver der de to motstående stavene utgjør et stavpar. De to stavparene pålegges et elektrisk felt, og avhengig av feltstyrken vil ioner med forskjellig  $m/z$ -verdi kunne passere gjennom kvadrupolen og inn i detektoren. Iones ladning er som regel 1 for små molekyler som legemidler, og dette gjør at avbøyningen kun er avhengig av massen til ionene.

Til slutt registrerer detektoren mengden av ioner som dannes og hvilke masser disse ionene har. Intensiteten av ioner plottes i et stolpediagram som funksjon av  $m/z$ , noe som utgjør stoffets massespektrum [50].

## Innledning



Figur 2 – Total ionestrømskromatogram med tilhørende massespektrum for topp nr.4 [50]

I kombinasjon med kromatografi kan massespektrometret opereres etter to forskjellige prinsipper:

- Opptak av spektre ("full scan")
- Selektiv ionemonitorering

Ved full scan vil det tas opp massespektre under hele separasjonen, ved at masseanalysatoren separerer ut massene én etter én. Denne metoden er vanlig dersom man ønsker å innhente mye strukturinformasjon om de separerte analyttene. Stoffene befinner seg i massespektret en meget kort stund, og det bør derfor tas opp spektre med svært korte mellomrom. 1-5 spektre per sekund er ofte vanlig, og på bakgrunn av disse kan det plottes et kromatogram som viser en topp for hvert av de separerte stoffene. Kromatogrammene plottes ved at alle de registrerte ioneintensitetene summeres for hvert massespektrum. Den totale mengde ioner plottes som funksjon av separasjonstiden og gir et totalt ionestrømskromatogram ("total ion current", TIC). Full scan metoden gir mye strukturinformasjon, men følsomheten begrenses, og det kan derfor være vanskelig å detektere stoffer i meget lave konsentrasjoner.

Ved analyser på svært lave konsentrasjonsnivåer og kvantitative bestemmelser er det vanlig å innstille massespektrometret til å måle på en, eventuelt et lite antall masser gjennom hele separasjonsperioden. Man foretar da en selektiv ionemonitorering (SIM), der et massekromatogram viser intensiteten til den registrerte massen som funksjon av retensjonstiden. Toppene som vises i massekromatogrammet stammer derfor kun fra stoffer i blandingen som gir den valgte massen under fragmentering [50].



### 1.5.7 Isotop ratio massespektrometri

Til tross for at bruk av steroidprofil og eventuelle utslag på forskjellige parametere som f.eks. T/E-ratio kan gi en god indikasjon på tilførsel av steroider, kan det likevel ikke regnes som et fellebevis med påfølgende dom [38]. Isotop ratio massespektrometri (IRMS) er en teknikk som måler karbon isotop-forholdet til  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , og som på den måten kan differensiere mellom endogene og syntetisk produserte steroider [51].

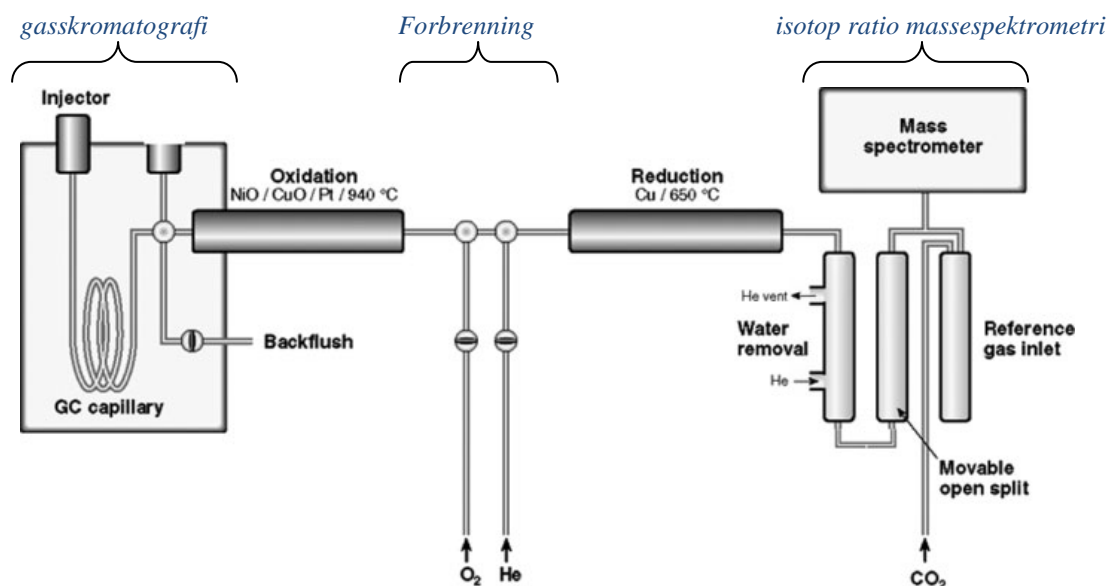
Bakgrunnen for at mistenkelige dopingprøver kan bekreftes med IRMS er at eksogene og endogene steroider inneholder ulik mengde  $^{13}\text{C}$ . Begge typer har til syvende og sist et opphav fra planter. Testosteron produsert i gonadene er avledet fra forskjellige vegetariske plantematerialer spist av mennesker eller av dyr som blir fortært av mennesker [23]. Eksogent testosteron eller forløpere inneholder som regel mindre  $^{13}\text{C}$  enn deres respektive endogene homologer, og man kan dermed fastslå at tilhørende steroidprofil fra urin med lav  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio, har spor av farmasøytisk preparat. Endogene steroider blir syntetisert med kolesterol som utgangspunkt. Kolesterol er avledet fra et variert mangfold av vegetariske og animalske forløpere. I plantevev blir variasjonen i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -forholdet bestemt av de forskjellige fotosyntetiske veiene for  $\text{CO}_2$ -opptak. Planter kan binde opp  $\text{CO}_2$  via tre forskjellige mekanismer: C3-, C4- og CAM-fotosyntese. C3- fotosyntesen resulterer i en stor endring i karbon-isotop andelene i forhold til atmosfærisk  $\text{CO}_2$ , og skiller i større grad ut den tyngre  $^{13}\text{C}$ -isotopen sammenlignet med C4- veien.  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -forholdet fra endogene steroider vil reflektere hver og ens individuelle diett, fra en kombinasjon av C<sub>3</sub> og C<sub>4</sub> planter. Farmasøytisk produsert testosteron stammer imidlertid kun fra plantematerialet C<sub>4</sub> soya. Av denne årsak vil eksogent tilførte steroider i de fleste tilfeller vise et redusert  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -forhold [52].

Ulikheter i karbon isotop-forholdet betegnes med symbolet  $\delta$  og ble i utgangspunktet definert som forskjellen i isotop-forhold mellom analytten og en internasjonal karbonatstandard kalt Pee Dee Belemnite, PDB [23]. PDB ble gitt verdien null på  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -skalaen. I senere tid er det introdusert en ny standard, Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB), der  $\delta^{13}\text{C}$ -verdien er +1,95 ‰ i forhold til forgjengeren sin PDB.  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -skalaen benyttes for å bestemme  $\delta^{13}\text{C}$ -verdier som forskjell fra VPDB målt i promille, basert på følgende likning:

$$\delta^{13}\text{C} = ((r_{\text{prøve}} / r_{\text{standard}}) - 1) \times 1000 \quad r = (^{13}\text{C}/^{12}\text{C}) \quad [51]$$

## Innledning

Referanseverdiene for endogene og eksogene steroidmetabolitter er små (hhv.  $\delta^{13}\text{C} = -15\text{‰}$  til  $-25\text{‰}$  mot  $-26\text{‰}$  til  $-36\text{‰}$ ), men målbare og statistisk signifikante, noe som gjør at IRMS kan benyttes til å bekrefte misbruk av steroider [51].



Figur 3 – Skisse av et typisk GC-C-IRMS instrument brukt for doping kontroll. Separasjon via GC, deretter en forbrenning av analyttene til  $\text{CO}_2$ , før gassen føres inn i MS der den ioniseres og måles [51].

IRMS-metoden for å kunne bestemme den isotopiske komposisjonen av den relevante analytten innebærer gasskromatografisk separasjon, deretter forbrennes analyttene til  $\text{CO}_2$ .  $\text{CO}_2$ -gassen som dannes føres inn i et multioppsamlings massespektrometer (se Figur 3).

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -verdien til testosteron eller dens metabolitter blir målt og deretter sammenlignet med referansesteroider fra urinprøven for å ta variasjon i utøverens diett med i betraktningen [38]. Selve målingen gjøres ved at tre "Faraday cups" samler opp ionene  $m/z$  44, 45 og 46, som representerer henholdsvis  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^{+}$ ,  $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^{+}$ ,  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^{+}$ , fra ionestrålen.  $m/z$  45/44-forholdet bestemmes for hver analytt. Før det beregnes  $^{13}\text{C}$  abundance korrigeres det for  $^{17}\text{O}$  abundance ved hjelp av  $m/z$  46/44-forholdet, som deretter trekkes fra  $m/z$  45 signalet før endelig  $^{13}\text{C}$  abundance kalkuleres [51]. Utøverens diett vil kunne påvirke utfallet av analysen og det er derfor utviklet metoder for å korrigere denne faktoren. Den eneste effektive metoden for å gjøre dette er foreslått å være ved å måle forskjellen mellom  $\delta^{13}\text{C}$ -verdien av en endogen referanse substans (*endogenous reference compound*, ERC), det vil si en steroidmarkør som

ikke er involvert i den androgene metabolismen, og utvalgte androgene metabolitter. Pregnan diol (PD) er et eksempel på en ERC [53].

WADA har siden 2004 satt følgende grenseverdi for positive funn:

- $\Delta\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = (\delta^{13}\text{C for ERC}) - (\delta^{13}\text{C for målt steroid}) > 3 (\text{‰})$ .
- $\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) \text{ for målt steroid} < -28.0 (\text{‰})$  [22].

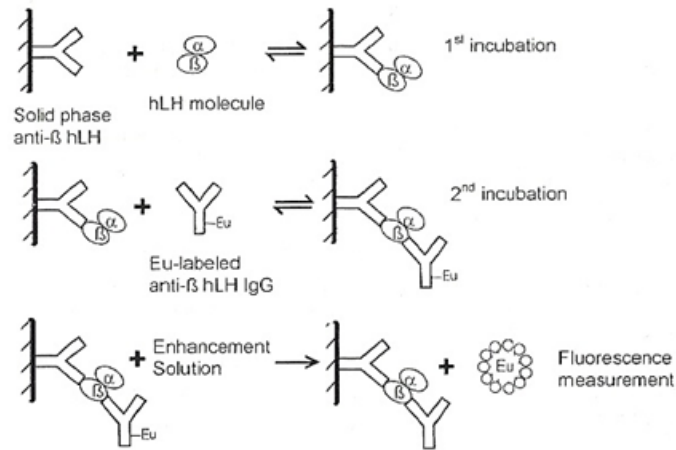
Alle metoder har sine svakheter, og som med måling av T/E-verdier der koadministrering av epitestosteron med testosteron kan maskere doping, vil det med IRMS-analyser kunne spekuleres i tilføring av en ERC [51]. Det er i tillegg en viss bekymring over at det er funnet syntetiske testosteronprodukter som inneholder uventet høyt nivå av  $^{13}\text{C}$ , noe som kan gjøre det mulig å unngå bekreftelse av nåværende IRMS-analyser [54].

Prøveopparbeidelsen før IRMS er svært viktig, og hovedoppgaven er å effektivt isolere rene substanser fra den komplekse biologiske matriksen urin, for å unngå koelueringer som kan gjøre IRMS bestemmelsen vanskelig. Til opprensingen benyttes high pressure liquid chromatography (HPLC). Steroidene har lav flyktighet og relativt høy polaritet, og av denne årsak benyttes oftest derivatisering i prøveopparbeidelsen for å unngå brede topper og haledannelse i GC-systemet [52].

### 1.5.8 Fast-fase fluoroimmunoassay

Immunoassay er en målemetode som kan bestemme forekomsten og konsentrasjonen av et stoff i en løsning. Det brukes ofte som verktøy for å undersøke prøver i diagnostikk og oppfølging av sykdom [55], og det er blant annet utviklet en fluoroimmunoassay-metode for bestemmelse av LH.

Prinsippet for fast-fase fluoroimmunoassay er at LH fra prøven bindes til fast-fase antistoff (anti- $\beta$  hLH) via antigen på  $\beta$ -subenheten til LH, som vist i Figur 4. Dette trinnet kan kalles "1.inkubering". 2.inkubering skjer ved at Europium-merkede antistoffer tilsettes og bindes til et annet sete på LH  $\beta$ -subenheten. Et reagens tilsettes og dissosierer europiumioner fra det merkede antistoffet (anti- $\beta$  hLH). Deretter danner de løselige europiumionene fluorescerende chelater med komponenter i reagenset som ble tilsatt. Måling av fluorescens kan så foretas, og resultatet er proporsjonalt med konsentrasjonen av LH i prøven [56].



Figur 4 – Prinsipp for fluoroimmunoassay for LH [56]

## 1.6 Problemstilling

Endringer i steroidprofil i urin kan indikere misbruk av testosteron eller dens forløpere, og bruk av steroidprofiler har vært en del av rutineanalysene innen dopingkontroll siden 1980-tallet. En stor inter-individuell variasjon i steroidkonsentrasjoner og utvalgte ratio gjør det imidlertid problematisk å basere utvelgelse av mistenkelige prøver på populasjonsbaserte kriterier. Genetisk variasjon er den viktigste årsaken til denne inter-individuelle variasjonen i utskillelse av testosteronmetabolitter [24].

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke hvordan steroidprofilen påvirkes hos menn, med hensyn til UGT2B17-genotype, etter anvendelse av lave doser testosteron i form av gel og injeksjon.

Foruten konsentrasjon av de ulike steroidene var det av interesse å undersøke hvordan ulike ratio, spesielt T/E-ratio, ville forandre seg i løpet av prøvetakingsperioden. Dagens gjeldende retningslinjer sier at urinprøver med T/E-ratio som overskrider cut-off verdien på 4 skal undersøkes nærmere [22], og det var av interesse å finne ut om denne grensen overskrides ved inntak av lavdose testosteron.

Videre var det av interesse å undersøke om det var mulig å detektere lave doser testosteron eller testosteronmetabolitter av eksogent opphav, ved hjelp av analyse ved IRMS.

## 2 Materialer

### 2.1 Kjemikalier og utstyr

Tabell 2 – Steroidene som ble benyttet og deres leverandører

Steroider	Leverandør
Metyltestosteron	Sigma-Aldrich. Schnelldorf, Tyskland
D <sub>3</sub> -testosteron	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
D <sub>3</sub> -5 $\alpha$ -androstandiol	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
D <sub>5</sub> -5 $\beta$ -androstandiol	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
D <sub>3</sub> -epitestosteron	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
D <sub>5</sub> -etiokolanolon	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
D <sub>4</sub> -androsteron	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
Testosteron	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
Epitestosteron	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
5 $\alpha$ -androstandiol	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
5 $\beta$ -androstandiol	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
6 $\beta$ -OH-androsteron	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
6 $\beta$ -OH-etikolanolon	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
11 $\beta$ -OH-androsteron	Sigma-Aldrich. Schnelldorf, Tyskland
11 $\beta$ -OH-etikolanolon	Sigma-Aldrich. Schnelldorf, Tyskland
Androsteron	Sigma-Aldrich. Schnelldorf, Tyskland
Etiokolanolon	Sigma-Aldrich. Schnelldorf, Tyskland
DHT	Australian Government National Measurement Institute, Pymble, Australia
DHEA	Steraloids, Rhode Island, USA
Pregnandiol	Sigma-Aldrich. Schnelldorf, Tyskland

## Materialer

Tabell 3 – Legemidlene som ble brukt i studien

Legemiddelnavn	Virkestoff	Leverandør
Testogel <sup>®</sup>	Testosteron	Bayer-Schering
Testoviron <sup>®</sup> Depot	Testosteron enantat	Bayer-Schering

Tabell 4 - Utstyr til prøveopparbeidelsen

Utstyr	Typebetegnelse	Leverandør
Slipglass	Quickfit MF 24/1/5	VWR International, Oslo, Norge
Slipglass	Quickfit MF 24/1/4	VWR International, Oslo, Norge
Varmeskap	Termaks	VWR International, Oslo, Norge
Whirlmixer	Vortex genie 2	Scientific industries, USA
Vekt	AG204 DeltaRange	Mettler Toledo, Oslo, Norge
Nitrogen inndampere	Dri-Block DB-3	Techne, Houm, Oslo, Norge
Refraktometer	UR-1	Atago Co, Tokyo, Japan
Ristemaskin	EB SM25	Houm, Oslo, Norge
Sentrifuge	Hettich Rotixa 50 RS	Houm, Oslo, Norge
pH-papir	Pehanal pH 1-11	Sigma-Aldrich

Tabell 5 – kjemikalier til prøveopparbeidelsen

Kjemikalier	Leverandør
Kaliumdihydrogenfosfat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Dikaliumhydrogenfosfat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Etantol	Merck-Schuehardt, Hohenbrunn, Tyskland
β-glukuronidase (E.coli)	Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland
Tert-butylmetyleter	Merck, Darmstadt, Tyskland
Saltsyre (37%)	VWR International AS, kalbakken, Norge
Metanol	VWR International AS, kalbakken, Norge
MSTFA,(N-metyl-N-trimetylsilyltrifluoracetamid)	Macherey-Nagel, Düren, Tyskland
Ammoniumjodid	Fluka Chemika, Steinheim, Sveits
Tris(hydroksymetyl)-aminometan	Merck, Darmstadt, Tyskland
Tørris	Yara, Oslo, Norge

Tabell 6 – Utstyr til GC-MS

Utstyr	Typebetegnelse	Leverandør
Autosampler	Aglient 7683 Series Injector	Matriks, Oslo, Norge
GC	Aglient 6890 Series GC system	Matriks, Oslo, Norge
MS	Aglient 5973 Network Mass Selective Detector	Matriks, Oslo, Norge
Dataprogram	Aglient MSD ChemStation Software, version D0200	Matriks, Oslo, Norge

## 2.2 Løsninger

### 2.2.1 Bruksløsninger

#### 6 M saltsyre

500 ml konsentrert saltsyre ble fortynnet med renset vann til 1000 ml i målekolbe.

#### 0,8/0,4 M fosfatbuffer til pH justering

5,44 g kaliumhydrogenfosfat og 13,93 g dikaliumhydrogenfosfat ble løst og fortynnet med renset vann til 100 ml i målekolbe. pH ble justert til 7,0.

#### 3 M Tris buffer til pH justering

363 g tris (hydroksymetyl)-aminometan ble løst og fortynnet med renset vann til 1000 ml i målekolbe. Løsningen ble overført til et begerglass og tilsatt ca 35 ml 6 M saltsyre til pH 9,8.

### 2.2.2 Derivatiseringsløsninger

#### Stock-løsning - MSTFA:NH<sub>4</sub>I:etantiol (1000:20:60) (v:w:v)

40 mg NH<sub>4</sub>I ble innveid i slipglass og tilsatt 2 ml MSTFA. Dette ble oppvarmet på varmeblokk ved 70°C til alt var løst, ca 1 time. Løsningen ble så avkjølt og tilsatt 120 µl etantiol.

#### Bruksløsning (MSTFA:NH<sub>4</sub>I:etantiol (1000:2:6) (v:w:v))

220 µl av stamløsningen ble blandet med 2 ml MSTFA.

### 2.2.3 Kalibratorløsninger

For å lage kalibratorløsninger ble det tilsatt stock- og bruksløsninger av de ulike analyttene i målekolber. Deretter ble det tilsatt kunstig urin opp til 50 ml, som så ble fordelt i 5,5 ml porsjoner i ni alikvotglass, som hver ville holde til to prøveserier (2 x 2,5ml). Se appendiks 1 for tabeller med oppsett for tillaging av de ulike kalibratorløsningene.

Tabell 7 – Konsentrasjon av stoffene i kalibreringskurven

Stoff/kalibrator	1 ng/ml	2 ng/ml	3 ng/ml	4 ng/ml	5 ng/ml
Testosteron	2	20	60	140	200
Epitestosteron	2	20	60	140	200
5 $\alpha$ -androstadiol	10	100	300	700	1000
5 $\beta$ -androstadiol	10	100	300	700	1000
6 $\beta$ -OH-androsteron	8	80	240	560	800
6 $\beta$ -OH-etikolanolon	10	100	300	700	1000
11 $\beta$ -OH-androsteron	15	150	450	1050	1500
11 $\beta$ -OH-etikolanolon	10	100	300	700	1000
Androsteron	100	1000	3000	7000	10000
Etikolanolon	100	1000	3000	7000	10000
DHT	2	20	60	140	200
DHEA	2	20	60	140	200
Pregnandiol	10	100	300	700	1000

### 2.2.4 Internstandard til kvantifisering

Det ble brukt en internstandard-blanding som inneholdt 6 internstandarder. D<sub>4</sub>-androsteronglukuronid ble tilsatt som hydrolysekontroll i prøveoppbevaringen. Tabell 8 viser konsentrasjonen til de ulike internstandardene i screeningen.

Tabell 8 – Konsentrasjon av internstandarder

Stoff (internstandard)	Konsentrasjon
Metyltestosteron	25 ng/ $\mu$ l
d <sub>3</sub> -testosteron	10 ng/ $\mu$ l
d <sub>3</sub> -epitestosteron	2,5 ng/ $\mu$ l
d <sub>3</sub> -5 $\alpha$ -androstadiol	15 ng/ $\mu$ l
d <sub>5</sub> -5 $\beta$ -androstadiol	10 ng/ $\mu$ l
d <sub>5</sub> -etikolanolon	20 ng/ $\mu$ l
d <sub>4</sub> -androsteronglukuronid *	10 ng/ $\mu$ l

\* Angitt konsentrasjon tilsvarer fritt d<sub>4</sub>-androsteron ved fullstendig hydrolyse.



## 3 Eksperimentelt

### 3.1 Studien

Det ble utført en åpen crossover studie med ti friske frivillige menn. Det ble i forkant av studien søkt om og innvilget godkjenning fra Regional etisk komité (REK).

#### 3.1.1 Forsøkspersoner

Det ble satt følgende inklusjonskriterier for studien:

- Friske, frivillige menn
- Alder 20-40 år
- Ikke aktive idrettsutøvere
- Europeisk opprinnelse

Til studien ble det rekruttert en gruppe på ti menn mellom 20 og 30 år, de fleste studenter ved Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo. Deltagerne fikk i forkant av studien utlevert et informasjonsskriv (appendiks 2). Her fikk de informasjon om blant annet formålet med studien, hva som skulle gjøres og andre relevante opplysninger. Etter å ha lest dette ble det underskrevet skjema for informert samtykke.

#### 3.1.2 Gjennomføring av studien

Selve prøvetakingen ble inndelt i to perioder. I den første delen av studien fikk deltagerne tilført testosteron i form av en gel påført på huden (Testogel<sup>®</sup>), mens de i andre delen av studien fikk tilført testosteron i injeksjonsform (Testoviron<sup>®</sup> Depot). Det ble utlevert urinprøveflasker før hver periode, totalt 33 stk. Prøvene skulle tas fortrinnsvis om morgenen og deretter fryses inntil overlevering for videre oppbevaring i fryserom på Aker. Deltagerne fikk også utlevert et flytskjema for bedre oversikt over hva som skulle skje til hvilken tid (appendiks 3). På skjemaet var det satt av plass til eventuelle merknader deltageren måtte ha, slik som større alkoholinntak, bruk av legemidler, annet tidspunkt for prøvetaking etc. I tillegg til urinprøvene ble det tatt 1 blodprøve fra samtlige deltagere og sendt til Avdeling for vekst og reproduksjon ved Rigshospitalet i København, for karakterisering av UGT2B17-

genet til hver av de respektive deltagerne ved hjelp av polymerase chain reaction (PCR) analyse.

I del 1 skulle deltagerne først samle "blank" urin i fem sammenhengende dager med den hensikt å etablere en referanseprofil. På dag 5 startet første påføring med Testogel® (50mg). Testogel® ble påført hver dag i en uke og det ble samlet urinprøver hver dag, til og med en uke etter siste Testogelapplisering. Totalt gav dette 19 prøver per deltager. Det ble sørget for en "utvaskingsperiode" på minst fire uker etter del 1, før oppstart av del 2.

Del 2 startet med en injeksjon av Testoviron® Depot (125mg dose, 0,5 ml a 250 mg/ml) på dag 1, med påfølgende prøveinnsamling de neste 14 dagene. Totalt sett ble det samlet 14 urinprøver per deltager i del 2.

## 3.2 Metode for analyse ved GC-MS

### 3.2.1 Validering

Metoden som ble brukt i denne oppgaven ble validert med hensyn på linearitet, presisjon og nøyaktighet, gjenvinning, LOD og LOQ, i en tidligere masteroppgave skrevet ved seksjon for dopinganalyse [57]. Som en kontroll ble KTE-verdier fra hver laboratorieserie notert for å avdekke eventuelle avvik og feil under prøveopparbeidelsen. KTE er urin som er tilsatt testosteronglukuronid og som dermed har en forhøyet T/E-ratio. Samtidig er KTE en intern kvalitetskontroll ved Norges laboratorium for dopinganalyse (NLD), for kvantifisering av endogene steroider, og konsentrasjonen av de endogene steroidene i KTE føres inn i kontrollkort [47].

### 3.2.2 Forarbeid

#### Fullscan

Det ble kjørt fullscan av alle analytter og internstandarder for å få informasjon om retensjonstider, fragmentering, samt de mest spesifikke og intense fragmentene. Dette ble gjort ved å ta tilsvarende 2,5 µg av stoffet fra en bruksløsning. Metanolen i bruksløsningen ble så dampet av med påfølgende tilsetning av derivatiseringsreagens. Etter derivatiseringen ble prøven kjørt på GC-MS.

### Området for kalibreringskurven

Et hensiktsmessig konsentrasjonsområde for kalibreringskurve er nødvendig for å kunne bestemme konsentrasjonene best mulig. Normalområder for stoffene finnes i litteraturen [32, 58]. I denne oppgaven ble det valgt samme konsentrasjonsområder som masteroppgaver av M. Lindøe og I. Liborg, tidligere utført ved NLD [57, 59].

For stoffene testosteron og epitestosteron, androsteron og etiokolanolon har WADA satt en grense på henholdsvis 200 ng/ml (testosteron og epitestosteron) og 10 000 ng/ml (androsteron og etiokolanolon). Urinprøver som overstiger disse grensene anses som mistenkelige, og skal bekreftes ved IRMS. Som øverste punkt på kalibreringskurven ble derfor disse konsentrasjonene brukt.

### 3.2.3 Prøveopparbeidelse

Til denne oppgaven ble det benyttet en prøveopparbeidelsesmetode for analyse av AAS som er etablert ved NLD. Figur 5 viser opparbeidelsen slik den ble gjort trinn for trinn.

Alle urinprøver ble målt for spesifikk vekt. Fra prøver med spesifikk vekt under 1,010 ble det tatt et prøveuttak på 5 ml mens det fra prøvene som lå over denne verdien ble tatt ut 2,5 ml. For hver serie ble det opparbeidet kalibreringskurve og en kontrollprøve med kjent konsentrasjon av analyttene.

### **Forarbeid**

Urinuttak i henhold til spesifikk vekt:

Spesifikk vekt  $\geq 1,010$ : Uttak 2,5 ml

Spesifikk vekt  $\leq 1,010$ : Uttak 5,0 ml

Følgende kontrollprøver tas med til hver serie:

2,5 ml vann **RBL**

2,5 ml blankurin **BL**

2,5 ml kunstig urin med de 5 ulike kalibratornivåene (**CAL 1 - CAL 5**)

2,5 ml kontrollurin **KTE**

1. + 50  $\mu$ l intern standard
2. + 200  $\mu$ l fosfatbuffer til pH 7 (sjekk med pH-papir)

### **Enzymatisk hydrolyse:**

3. + 100  $\mu$ l  $\beta$ -Glucuronidase per 2,5 ml urin
4. Prøvene inkuberes i varmeskap ved 50-55 °C i ca. 1 time

### **Væske-væske ekstraksjon:**

5. Prøvene avkjøles til romtemperatur, pH justeres til 9.5-9.8 med 0,2 ml 3 M Trisbuffer (sjekk med pH-papir)
6. + 5 ml t-butylmetyleter
7. Prøvene ristes ca. 10 min på ristemaskin
8. Sentrifugeres ca. 10 min ved 1200-1500 rpm
9. Vannfasen fryses i etanol/tørribad og organisk fase helles over i rene merkede 10 ml slipglass

### **Alikvot til GC-MS:**

10. Organisk fase fra pkt. 9 dampes inn på varmeblokk, 45-55 °C, under en strøm av nitrogen
11. Innsiden av glassveggene skylles ned med ca. 0,2 ml metanol
12. Prøvene dampes inn til tørrhet. OBS! Må være **helt tørt**
13. + 40  $\mu$ l derivatiseringsreagens
14. Derivatiseres på heteblokk ved 65-75 °C i ca. 20 min
15. Prøvene overføres til 2 ml autosamplerglass m/insert

### **Analyse ved GC-MS**

Figur 5 - Prosedyre for prøveopparbeidelse til GC-MS.

### 3.2.4 Analyseparametre

#### Instrument: GC-MS

#### GC-parametre:

Kolonne:	J & W Ultra 1 kapillærkolonne, kryssbundet 100 % metylsilikon, 17 m x 0,2 mm, filmtykkelse 0,11 µm
Injeksjonsvolum:	1 µl
Splitt:	1 : 20
Bæregass:	Helium, 0,9 ml/min
Temperaturprogram:	Starttemperatur på 180 °C, varmes opp til 231 °C med en hastighet på 3,3 °C/min. Deretter økes oppvarmingshastigheten til 30 °C/min opp til 310 °C, der den holdes konstant i 2 minutter.

#### MS-opptaksparametre:

Ionisering: Elektronionisasjon

Instrumentet ble innstilt på single ion monitoring (SIM).

Tabell 9 – Ioneprogram for MS

Gruppe 1 5.00 min - 11.69 min	Gruppe 1 11.70 min - 14.69 min	Gruppe 1 14.70 min - 17.00 min
241,1	275,2	117,1
244,1	290,2	255,2
246,1	399,3	301,2
256,2	414,3	435,3
272,2	417,3	449,3
419,3	419,3	
434,3	432,3	
438,3	434,3	
439,3	435,3	
	437,3	
	522,4	

### 3.2.5 Identifikasjon og kvantifisering

For å identifisere stoffene ble to ioner valgt ut for hvert stoff, se Tabell 10. Begge disse må ha riktig retensjonstid for at stoffet skal være identifisert. I tillegg skal retensjonstiden og forholdet mellom de to ioneintensitetene sammenlignes mot en kalibratorprøve.

Tabell 10 – Identifikasjonsioner og kvantifiseringsioner (uthevet) for analyttene

Analytt	Identifikasjonsioner
Testosteron	<b>432</b> , 417
Epitestosteron	<b>432</b> , 417
5 $\alpha$ -androstandiol	<b>241</b> , 256
5 $\beta$ -androstandiol	<b>241</b> , 256
6 $\beta$ -OH-androsteron	<b>522</b> , 417
6 $\beta$ -OH-etikolanolon	<b>522</b> , 417
11 $\beta$ -OH-androsteron	<b>522</b> , 417
11 $\beta$ -OH-etikolanolon	<b>522</b> , 417
Androsteron	<b>434</b> , 419
Etikolanolon	<b>434</b> , 419
DHT	<b>434</b> , 419
DHEA	<b>432</b> , 417
Pregnandiol	<b>117</b> , 449

Urinprøvene varierer med tanke på om de er konsentrerte eller fortynnet, og således vil også konsentrasjonen av stoffene i urinen variere. For å sammenligne konsentrasjonene i de ulike prøvene best mulig, ble urinkonsentrasjonene korrigert til en spesifikk vekt på 1,020, definert som normal tetthet.

Følgende formel ble brukt for korrigering til spesifikk vekt på 1,020:

$$C_{1.020} = (1.020 - 1) / (\text{spesifikk vekt}_{\text{prøve}} - 1) \times C_{\text{prøve}}$$

[22]

Kvantifiseringen ble gjort ved hjelp av en fem punkts kalibreringskurve, se Tabell 7.

## 3.3 Metode for analyse ved IRMS

Selve prøveopparbeidelsen og IRMS-analysen ble utført av en bioingeniør ved NLD. Metoden blir derfor kun kort gjennomgått.

## Ekperimentelt

Prøveopparbeidelsen består av fast-fase ekstraksjon med påfølgende enzymatisk analyse av konjugater. Deretter ble det utført en ny fast-fase ekstraksjon før steroidene ble kjørt på HPLC for oppsamling i fem eller seks ulike fraksjoner. Ekstraktene ble så kjørt på GC-MS for å bekrefte at de kromatografiske toppene tilhører de aktuelle steroidene. Videre ble de samme prøvene analysert på GC-C-IRMS og  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) verdiene til steroidene ble målt.

### 3.3.1 Instrument: GC-C-IRMS

#### GC parametre

Kolonne: 30 m x 0,25 mm, DB-17 MS, fused silica kapillærkolonne crosslinked metylsilikon, filmtykkelse 0,25 mm

Split mode (IRMS): Splittløs

Split mode (GC-MS): Splitt i forholdet 6:1

Bæregass: Helium, ca. 1.9 ml/min

Temperaturer: Interface: 280 °C  
Inj.port: 280 °C  
Ovn: 80 °C – 15 °C/min – 270 °C – 35 °C/min til 300 °C (2 min)

#### HPLC-UV parametre (til opprensning):

Kolonne: 4,6 mm x 15 mm, Zorbax C18

Mobilfase A: Vann (100 %)

Mobilfase B: Acetonitril (100 %)

Temperatur: 24 °C

Flow: 0,5 ml/min

UV: 195 nm

Injeksjonsvolum: 30 µl ved prøveopparbeidelse

### **3.4 Metode for fast-fase immunoassay LH-analyse**

Analyse av LH i utvalgte urinprøver ble utført av en bioingeniør ved Hormonlaboratoriet, Aker sykehus. Til analysene ble det benyttet et AutoDelfia hLH Spec kit. Kitet er en fast-fase, tosidig fluoroimmunoassay metode der to antistoffer bindes til  $\beta$ -enheten i LH, som beskrevet i avsnitt 1.5.8.

### **3.5 Metode for PCR-analyse**

Genanalyse av blodprøvene ble utført ved Rigshospitalet i København ved hjelp av PCR, etter samme prosedyre som ble benyttet i studie av Juul *et al.* [30].



## 4 Resultater

Over 99 % av urinprøvene fra forsøksperioden ble innlevert. Det var kun en urinprøve som ikke ble levert inn (deltager 8, dag 5 i blank periode). Av ti utleverte flytskjema ble åtte skjema innlevert, hvorav seks inneholdt merknader angående prøvetakingstidspunkt, moderat til stort alkoholkonsum eller bruk av betennelsesdempende legemiddel.

Resultatene blir vist som tabeller, grafer og boksplott, avhengig av hva som er den mest hensiktsmessige fremstillingen av tallmaterialet. I boksplottene viser boksen det interkvartile området fra nedre kvartil (Q1) til øvre kvartil (Q3), der 50 % av alle verdiene ligger innenfor. Punktet i boksen viser gjennomsnittet, mens den midterste streken viser medianen av tallverdiene.

### 4.1 Validering

Det ble som en kontroll notert KTE-verdier fra hver laboratorieserie for å avdekke eventuelle avvik og feil under prøveopparbeidelsen, se Tabell 11. T/E-ratio i KTE skal ligge mellom 4.7 og 5.4. Ingen av verdiene krysset øvre eller nedre grense som ble satt til  $3 * \text{standardavviket}$  i henhold til kontrollprosedyren ved NLD og ble derfor regnet som gyldige. Alle verdiene lå også innenfor  $2 * \text{standardavviket}$ .

## Resultater

Tabell 11 – KTE- verdier med tilhørende nivågrenser

Lab.nr	Dato	Andro	Etio	5a-diol	5b-diol	Epit	Testo	T/E
1	15.11.11	1595	999	59	126	11,4	57	5,0
2	01.12.11	1753	1039	60	135	11,6	57	4,9
3	20.12.11	1800	1003	65	133	11,4	56	4,9
4	06.01.12	2053	1138	69	131	11,8	61	5,2
5	06.01.12	2047	1141	70	135	11,7	61	5,2
6	11.01.12	1796	1091	63	134	11,5	60	5,2
7	13.01.12	1818	1095	64	134	11,8	60	5,1
8	20.01.12	1858	1121	62	136	11,3	59	5,1
9	23.01.12	1833	1136	59	133	11,8	59	5,0
10	26.01.12	1923	1104	67	134	11,6	59	5,1
	Snitt	1847	1087	64	133	11,6	59	5,1
	STDAV	136	54	4,1	2,8	0,20	1,96	0,12
	CV %	7,37	4,99	6,37	2,08	1,76	3,32	2,36
	GRENSER							
		Andro	Etio	5a-diol	5b-diol	Epit	Testo	T/E
	2*STDAV	272	108	8,1	5,5	0,41	3,9	0,24
	3*STDAV	408	163	12,2	8,3	0,61	5,9	0,36
	Øvre grense	2256	1250	76	141	12,2	64,8	5,4
	Nedre grense	1439	924	52	125	11,0	53,0	4,7

## 4.2 Prøveresultater

### 4.2.1 Genotyping av deltagerne

Genotyping viste at en deltager hadde en homozygot delesjon (*del/del*) av UGT2B17-genet. To personer hadde en heterozygot delesjon (*ins/del*), mens de resterende syv deltagerne var homozygote bærere av det intakte genet (*ins/ins*).

Hver deltagers gjennomsnittlige T/E-ratio, fra urinprøver tatt fem dager i forkant av første testosteronapplikasjon, ble satt som referanseverdi for denne deltageren, se Tabell 12.

Tabell 12 – Genotype og gjennomsnittlig T/E-ratio før testosteronapplikasjon

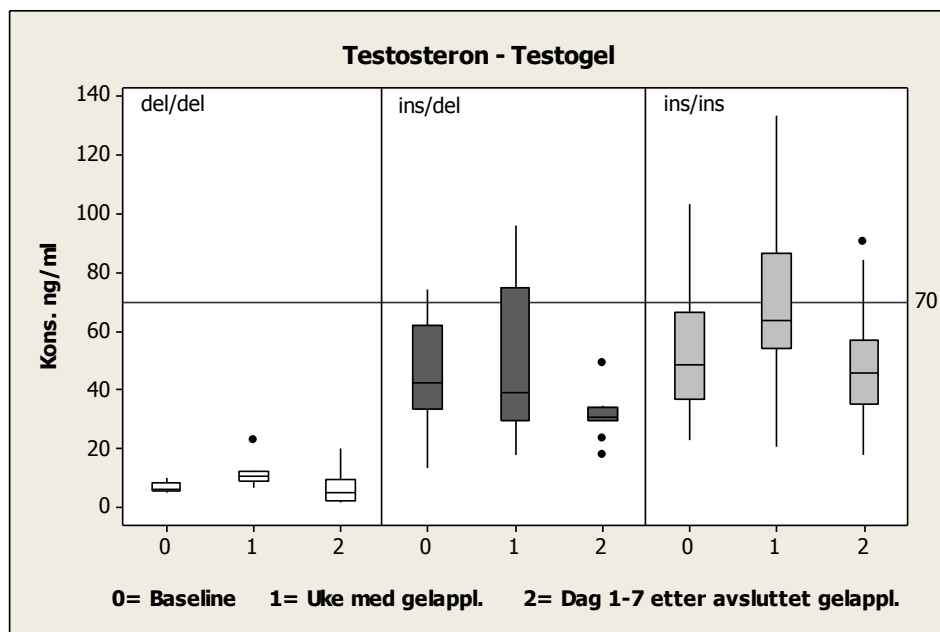
Deltager	UGT2B17 genotype	Baseline T/E ratio
1	<i>del/del</i>	0,41
2	<i>ins/ins</i>	0,94
3	<i>ins/ins</i>	0,70
4	<i>ins/ins</i>	1,73
5	<i>ins/ins</i>	1,87
6	<i>ins/del</i>	1,38
7	<i>ins/del</i>	0,75
8	<i>ins/ins</i>	0,71
9	<i>ins/ins</i>	0,70
10	<i>ins/ins</i>	1,91

#### 4.2.2 GC-MS- analyse av analyttene

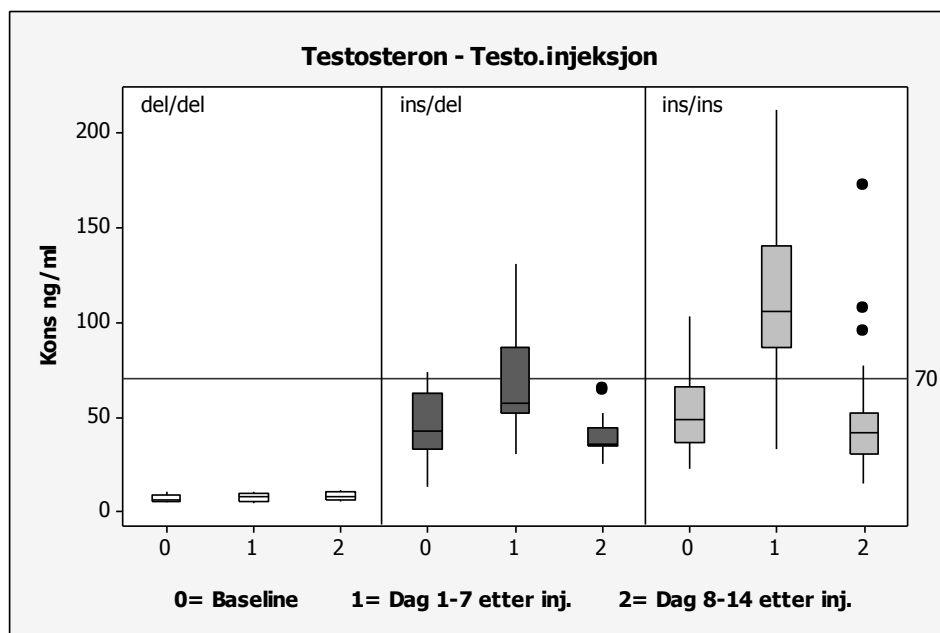
Alle urinprøvene fra deltagerne, 329 urinprøver totalt (deltager 8 leverte ikke prøve for dag 5 i blankperioden), ble analysert ved GC-MS. Det ble screenet for følgende 13 substanser: testosteron, epitestosteron, 5 $\alpha$ -androstadiol, 5 $\beta$ -androstadiol, 6 $\beta$ -OH-androsteron, 6 $\beta$ -OH-etikolanolon, androsteron, etikolanolon, DHT, DHEA, 11 $\beta$ -OH-androsteron, 11 $\beta$ -OH-etikolanolon og pregnandiol.

De påfølgende boksplokkene viser analyseresultatene for de ulike analyttene før, under, og etter applisering av Testogel<sup>®</sup>, samt før og etter injeksjon av Testoviron<sup>®</sup> Depot. Plottene er inndelt i tre ruter, en for hver genotype. To boksplokk per analytt viser forskjellene mellom de to ulike administrasjonsformene som er benyttet; gel og injeksjon. Det gjøres oppmerksom på at plottene til genotype *del/del* kun utgjør ett individ, og vil følgelig beskrive en intra-individuell variasjon. Genotypene *ins/del* og *ins/ins* inkluderer henholdsvis to og syv individer. I boksplokkene er det lagt inn en hjelpelinje for lettere å vurdere verdiene opp mot hverandre.

## Testosteron



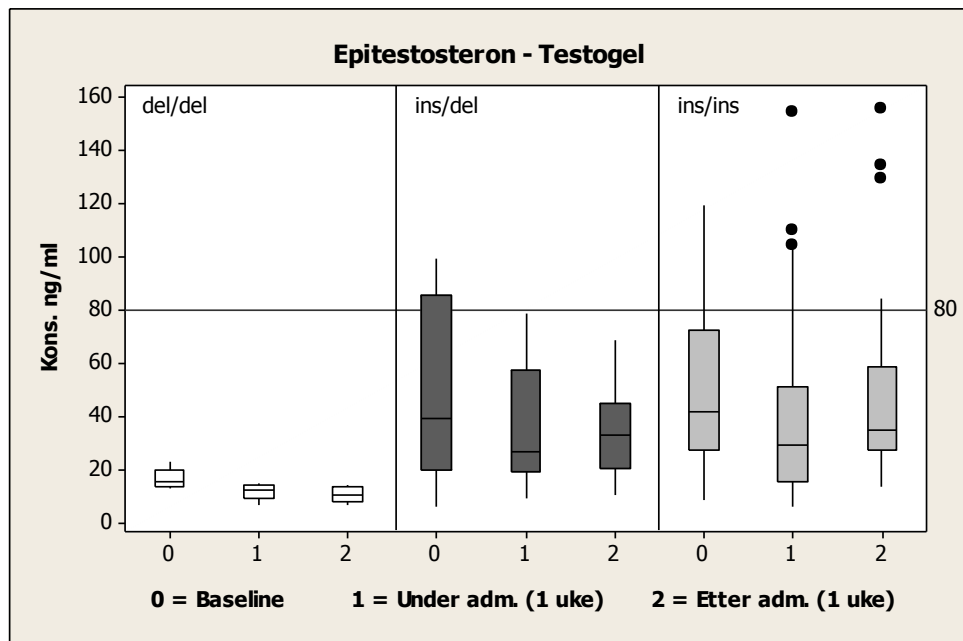
Figur 6 – Konsentrasjon av testosteron før, under og etter gelapplisering



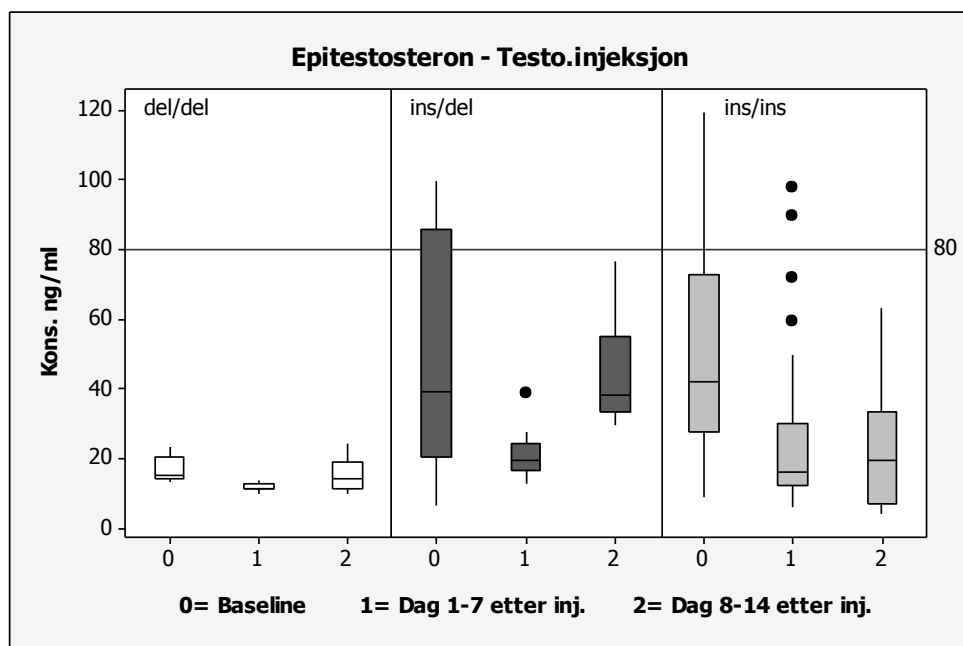
Figur 7 – Konsentrasjon av testosteron før og etter injeksjon av testosteron enantat

Figur 6 og Figur 7 viser at utskillelsen av testosteronglukuronid øker under gelperioden og ytterligere i dagene etter injeksjon, før den normaliseres. Stigningen fra baseline er signifikant for *ins/ins*-gruppen i begge perioder av studien (gel:  $P=0.002$ , inj:  $P<0.001$ ). *ins/del*-gruppen viste en signifikant økning kun etter injeksjon ( $P=0.028$ ), mens *del/del*-individet faktisk viser noe høyere testosteronkonsentrasjon under gelpåføring i forhold til injeksjon.

## Epitestosteron

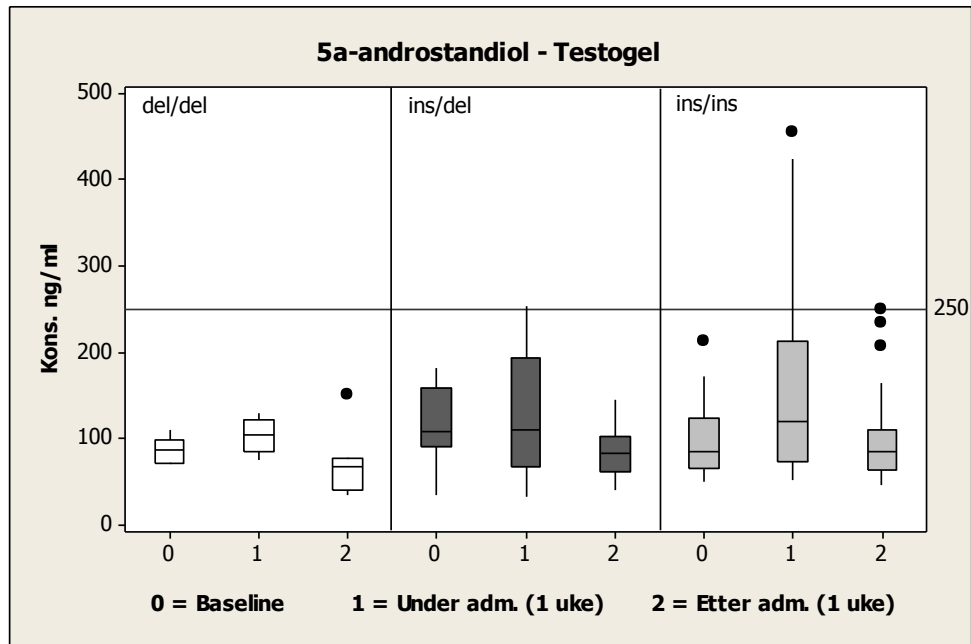
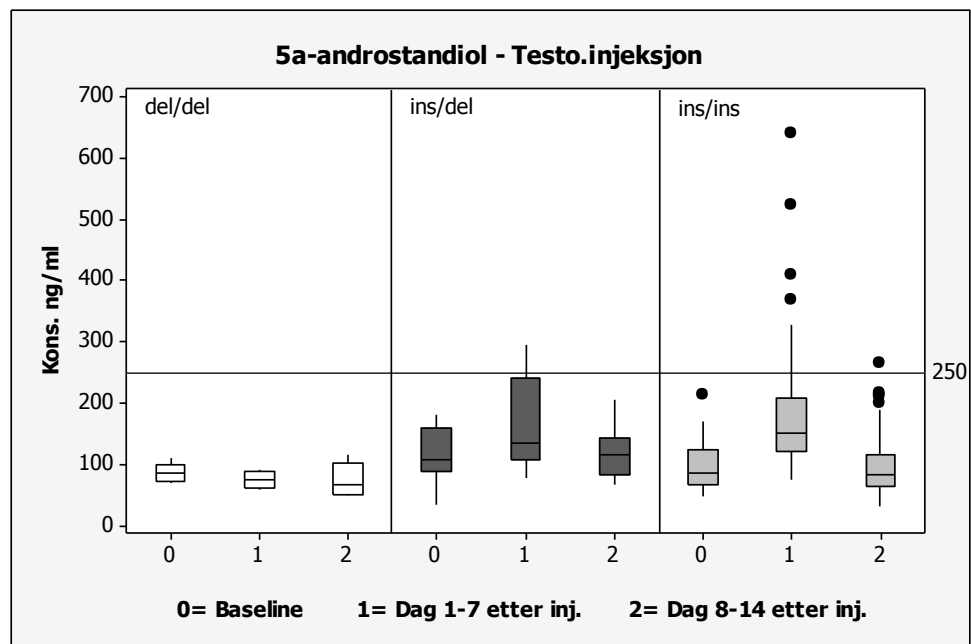


Figur 8 - Konsentrasjon av epitestosteron før, under og etter gelapplisering

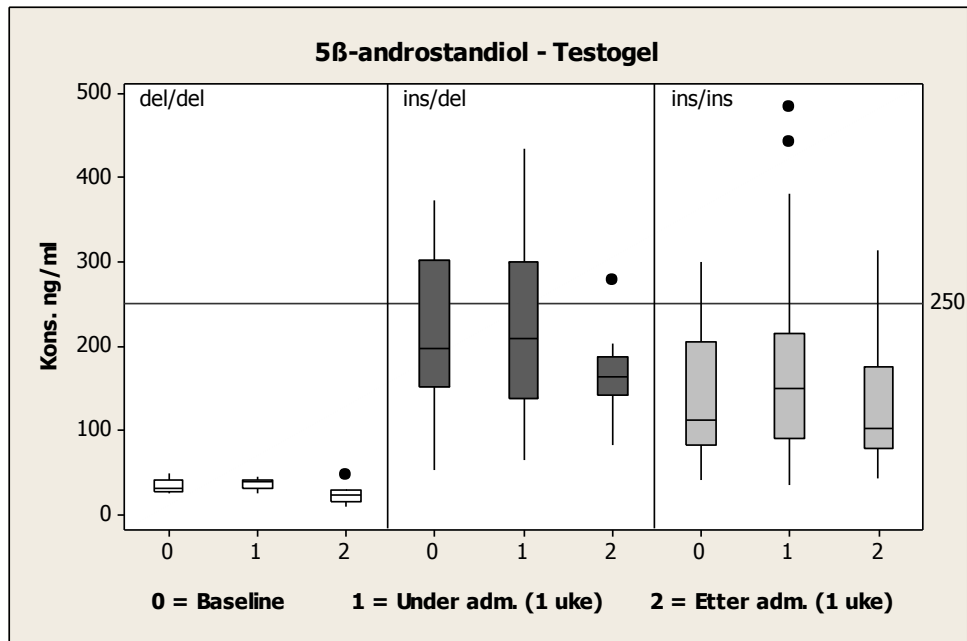
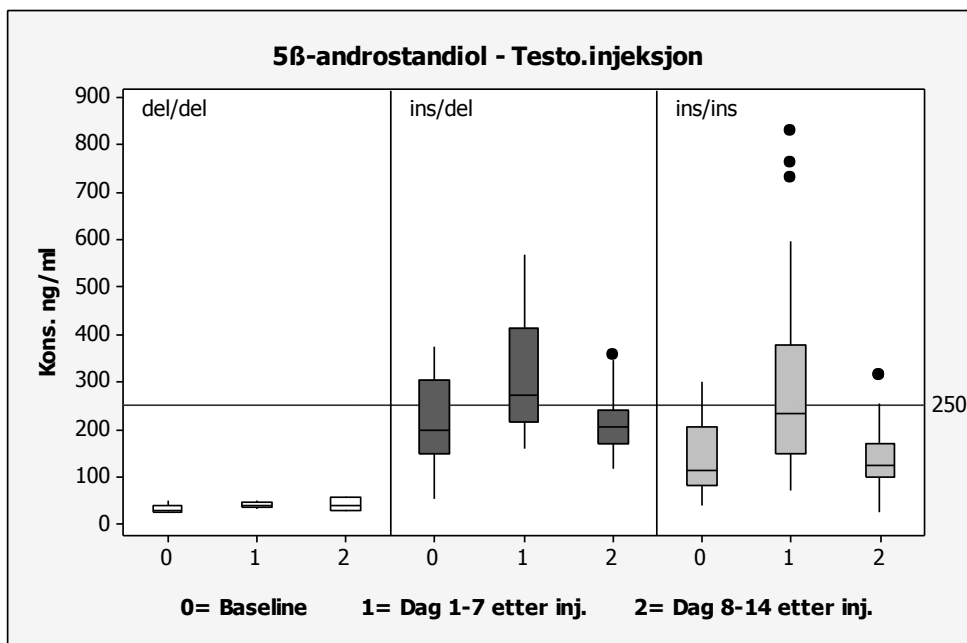


Figur 9 - Konsentrasjon av epitestosteron før og etter injeksjon av testosteron enantat

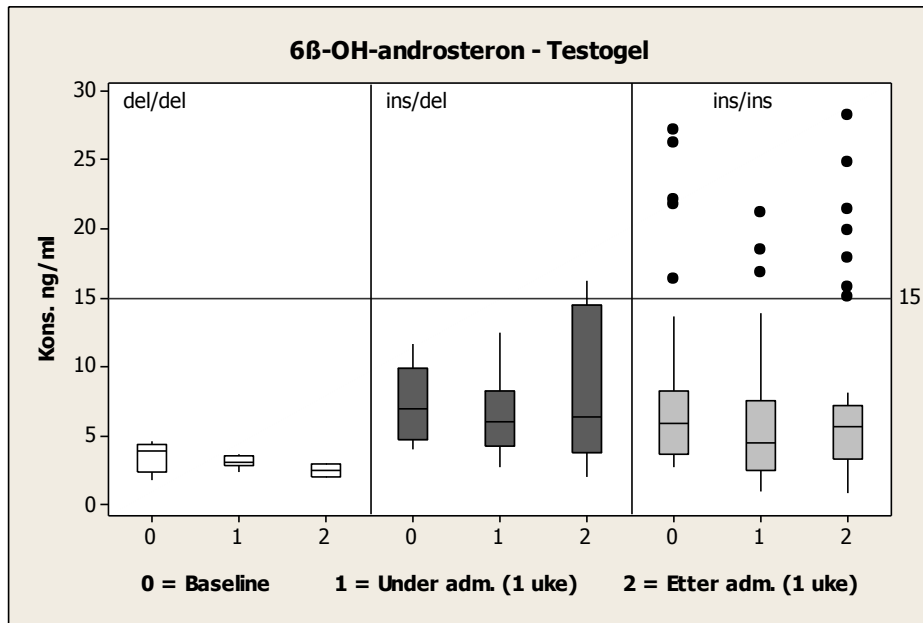
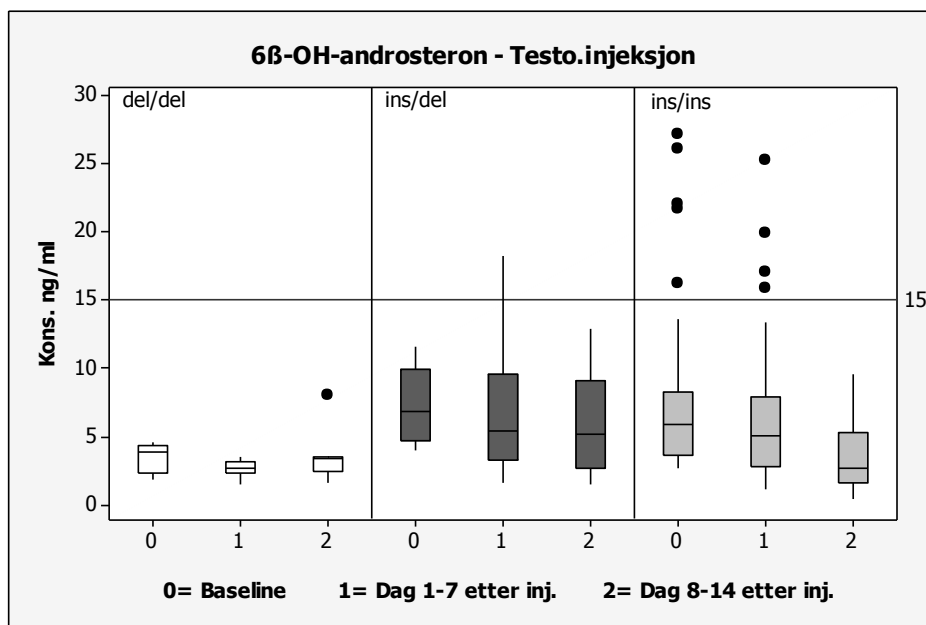
Figur 8 og Figur 9 illustrerer at epitestosteronutskillelsen reduseres under gelperioden og etter testosteroninjeksjon, før den igjen normaliseres. Effekten er noe mer markant etter injeksjon enn ved gelapplisering, dette vises mest tydelig for *ins/del* gruppen. Etter injeksjon er endringen fra baseline signifikant både for *ins/del*- ( $P=0.037$ ) og *ins/ins*- ( $P<0.001$ ) gruppene.

5 $\alpha$ -androstadiolFigur 10 - Konsentrasjon av 5 $\alpha$ -androstadiol før, under og etter gelappliseringFigur 11 - Konsentrasjon av 5 $\alpha$ -androstadiol før og etter injeksjon av testosteron enantat

I Figur 10 og Figur 11 observeres en økning i konsentrasjon av 5 $\alpha$ -androstadiol både under gelapplisering og etter injeksjon av testosteron. Unntaket er deltageren med *del/del*-genotype, som viser uendret eller noe lavere utskillelse etter injeksjon. Uteliggerne som sees i gruppen med *ins/ins* stammer fra en og samme deltager.

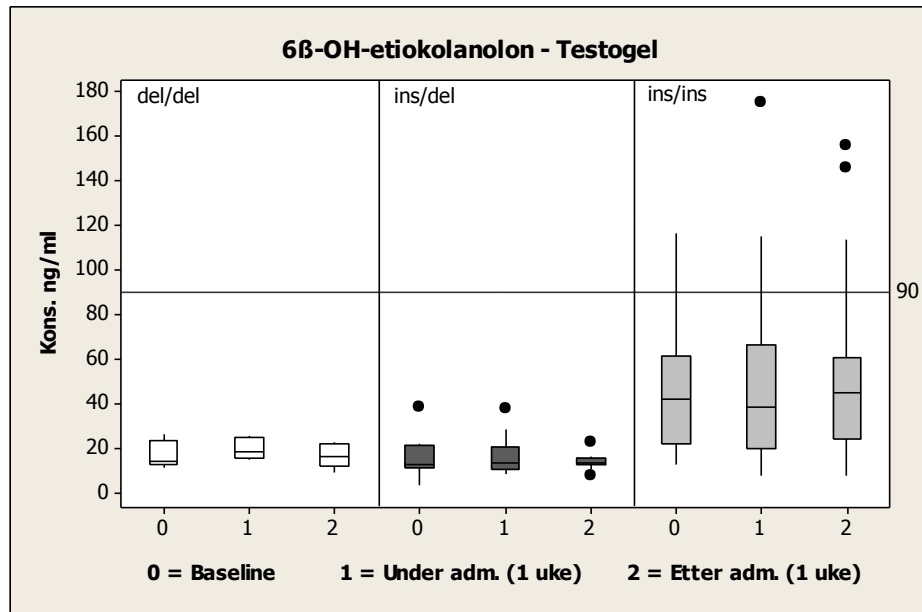
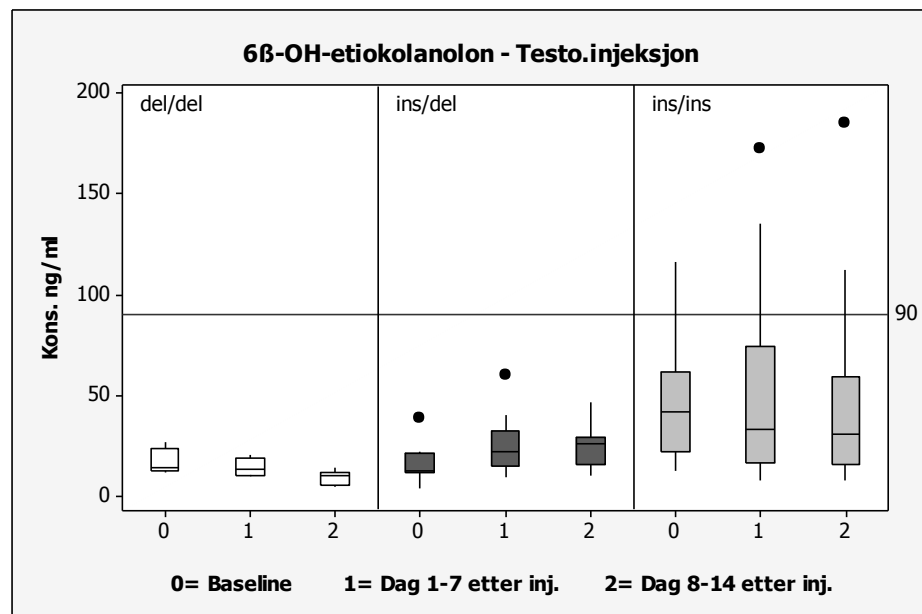
**5 $\beta$ -androstandiol**Figur 12 - Konsentrasjon av 5 $\beta$ -androstandiol før, under og etter gelappliseringFigur 13 - Konsentrasjon av 5 $\beta$ -androstandiol før og etter injeksjon av testosteron enantat

Utskillelsen av 5 $\beta$ -androstandiol økte lite under gelperioden, og noe mer etter injeksjon, noe Figur 12 og Figur 13 tydelig viser. Deltageren med *del/del*-genotype hadde lite endringer i konsentrasjonen.

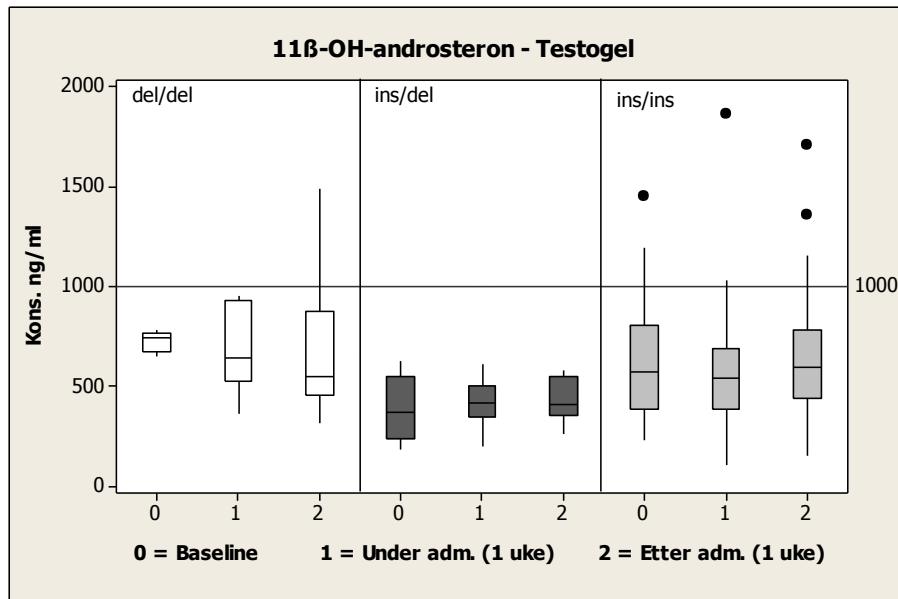
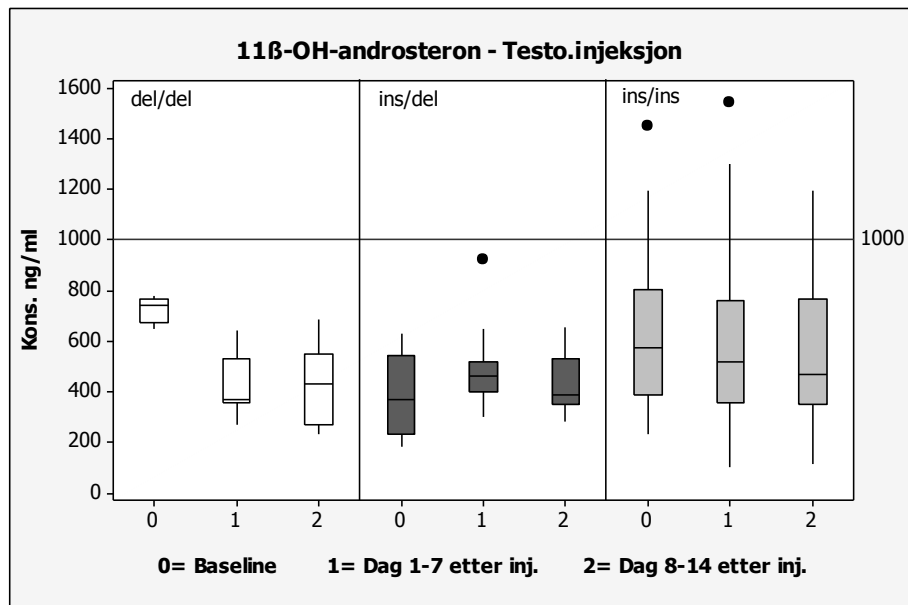
6 $\beta$ -OH-androsteronFigur 14 - Konsentrasjon av 6 $\beta$ -OH-androsteron før, under og etter gelappliseringFigur 15 - Konsentrasjon av 6 $\beta$ -OH-androsteron før og etter injeksjon av testosteron enantat

Konsentrasjonene av 6 $\beta$ -OH-androsteron var, som Figur 14 og Figur 15 viser, svært lave. Deltager 3 (*ins/ins*) viste generelt høyere verdier enn de andre individene, og disse vises som uteliggere i boksplottene. Mange av urinprøvene som ble analysert hadde konsentrasjoner som lå under laveste kalibratornivå, 8 ng/ml.



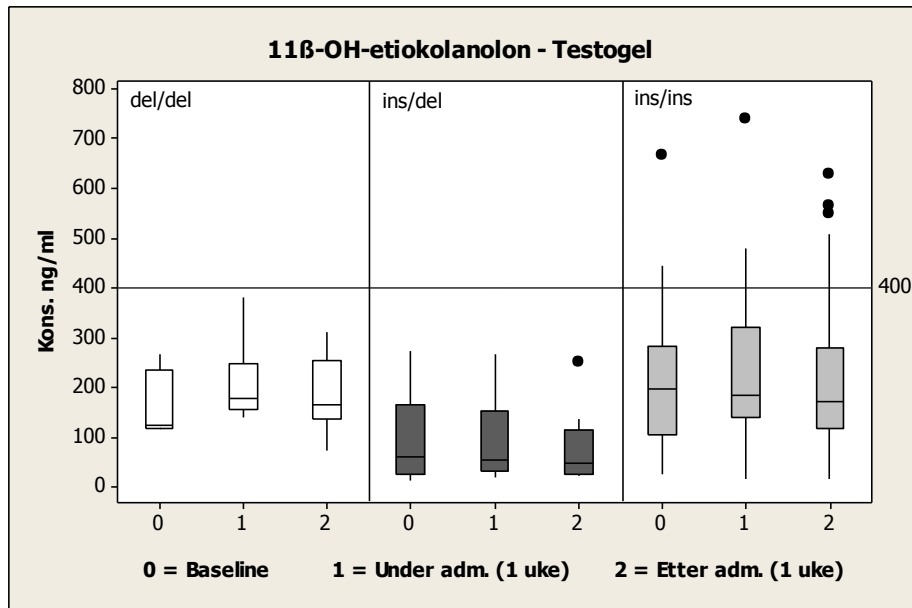
**6 $\beta$ -OH-etikolanolon**Figur 16 - Konsentrasjon av 6 $\beta$ -OH-etikolanolon før, under og etter gelappliseringFigur 17 - Konsentrasjon av 6 $\beta$ -OH-etikolanolon før og etter injeksjon av testosteron enantat

Figur 16 og Figur 17 illustrerer at deltagerne ikke viste store endringer i utskillelse av 6 $\beta$ -OH-etikolanolon, verken under gelapplisering eller etter injeksjon av testosteron. Gruppen med *ins/ins*-deltagere viser relativt stor inter-individuell forskjell i utskillelse.

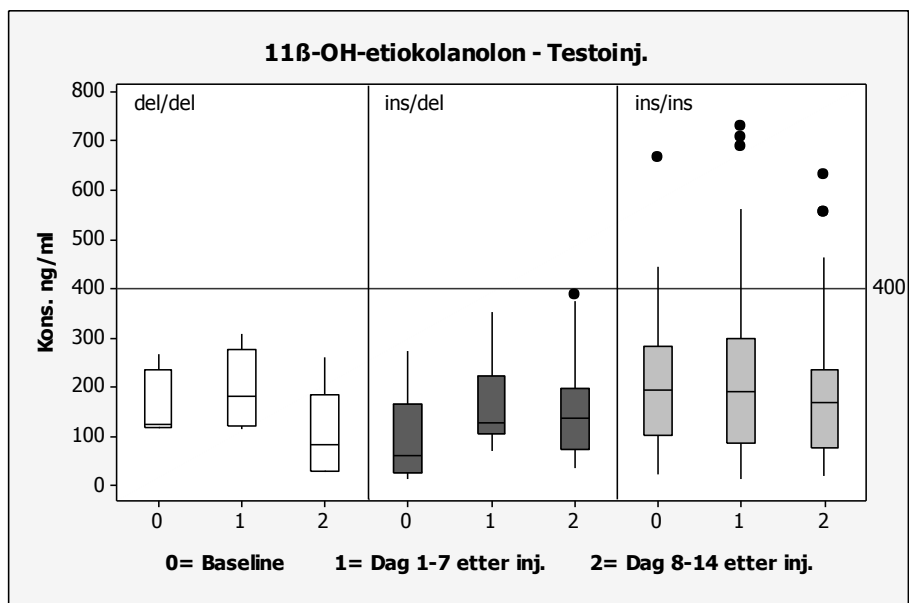
11 $\beta$ -OH-androsteronFigur 18 - Konsentrasjon av 11 $\beta$ -OH-androsteron før, under og etter gelappliseringFigur 19 - Konsentrasjon av 11 $\beta$ -OH-androsteron før og etter injeksjon av testosteron enantat

Deltager 1 med *del/del*-genotype viste noe varierende utskillelse av 11 $\beta$ -OH-androsteron, noe som illustreres i Figur 18 og Figur 19. Som boksploottene viser var det liten variasjon i utskillelsen av 11 $\beta$ -OH-androsteron for deltagerne med *ins/del*- og *ins/ins*-genotype.

## 11 $\beta$ -OH-etikolanolon



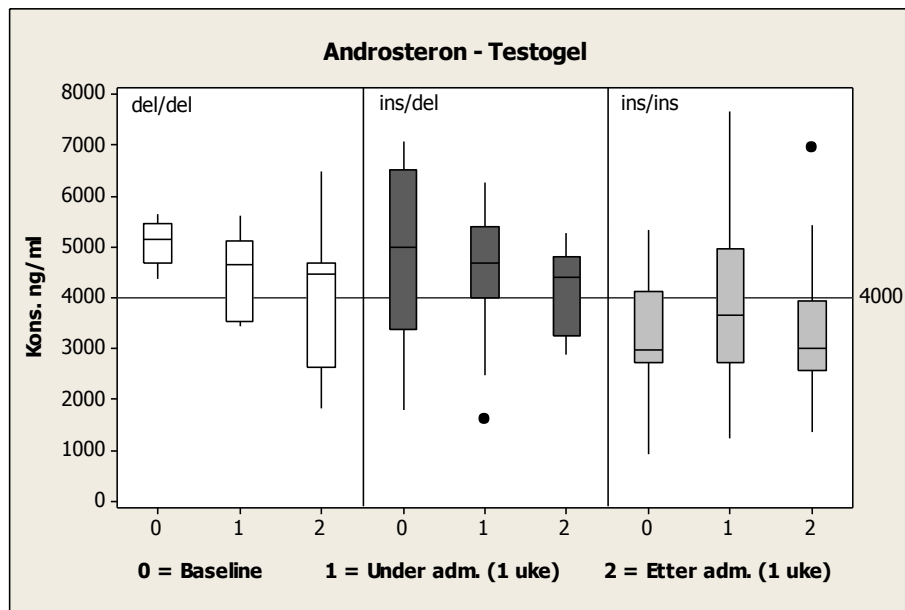
Figur 20 - Konsentrasjon av 11 $\beta$ -OH-etikolanolon før, under og etter gelapplisering



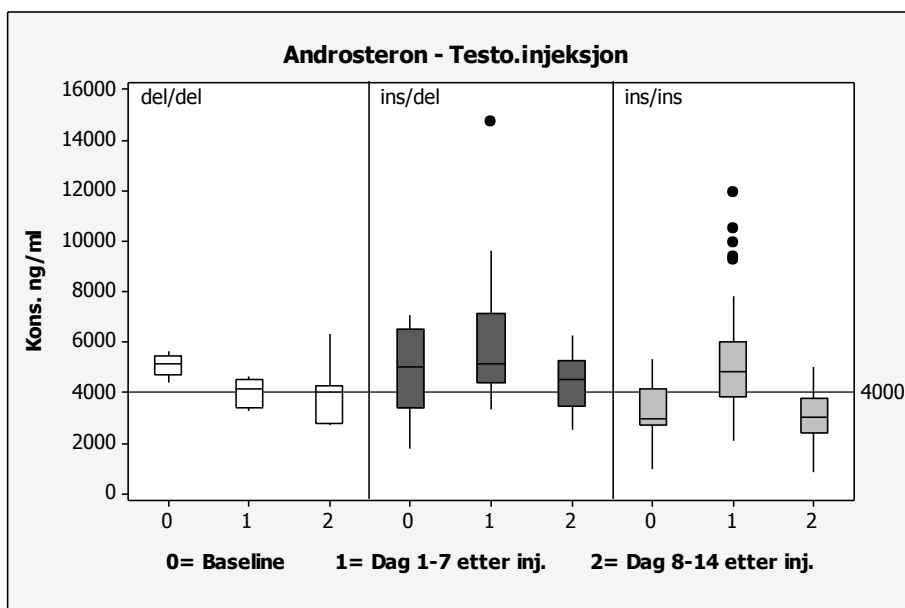
Figur 21 - Konsentrasjon av 11 $\beta$ -OH-etikolanolon før og etter injeksjon av testosteron enantat

Figur 20 og Figur 21 viser at deltagerne hadde generelt liten endring i konsentrasjon av 11 $\beta$ -OH-etikolanolon etter tilførsel av testosteron i de ulike periodene.

## Androsteron



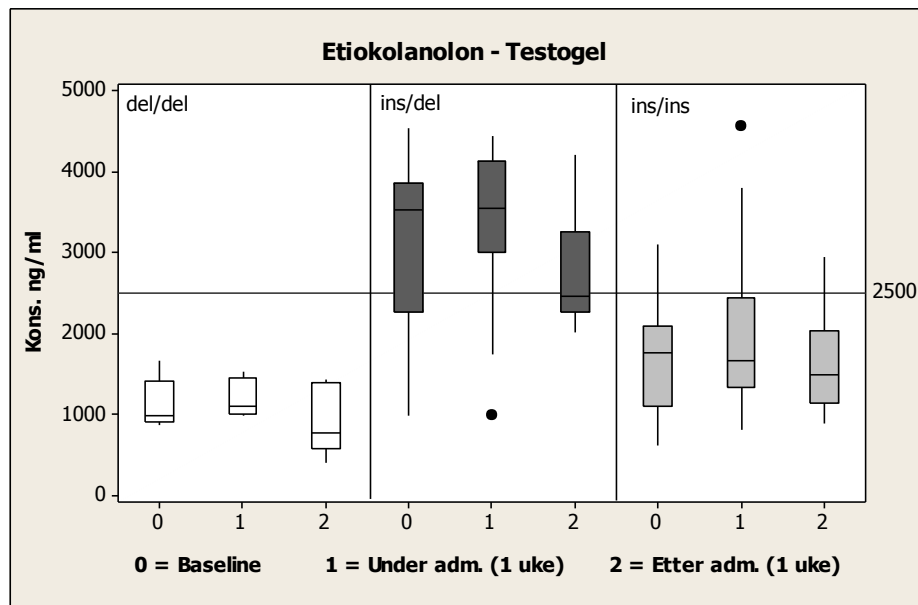
Figur 22 - Konsentrasjon av androsteron før, under og etter gelapplisering



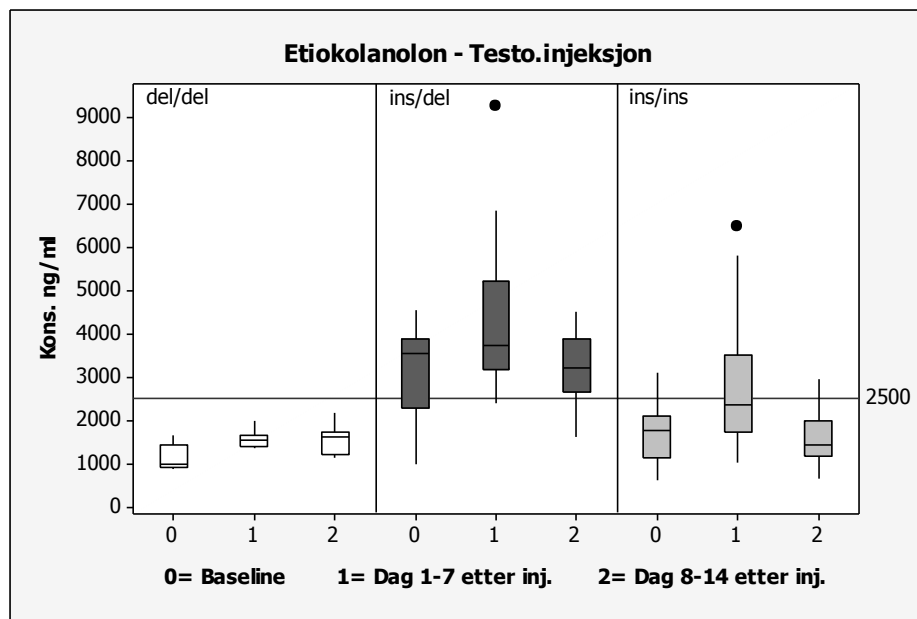
Figur 23 - Konsentrasjon av androsteron før og etter injeksjon av testosteron enantat

Androsteronkonsentrasjonen ser av Figur 22 og Figur 23 ut til å variere over et stort konsentrasjonsområde. I den grad tallmaterialet er stort nok, viste *del/del*-deltageren signifikant redusert konsentrasjon av androsteron etter testosteroninjeksjon ( $P=0.006$ ). For *ins/del*- og *ins/ins*-gruppene økte konsentrasjonen noe etter injeksjon (*ins/ins*:  $P<0.001$ ).

## Etiokolanolon



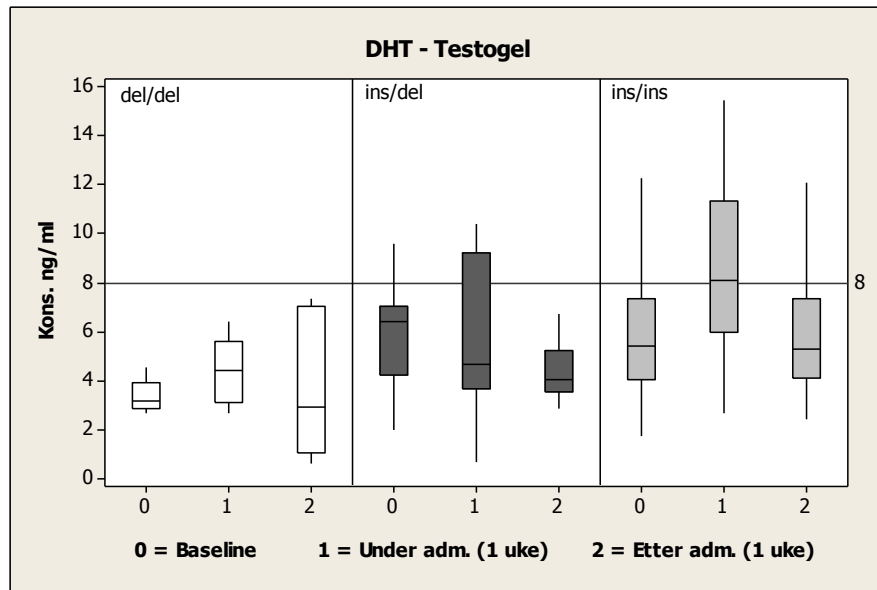
Figur 24 - Konsentrasjon av etiokolanolon før, under og etter gelapplisering



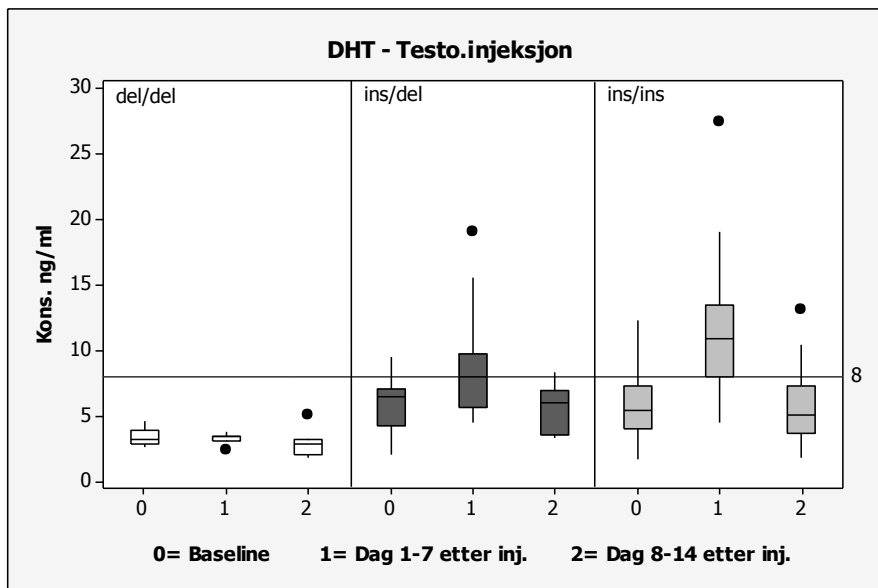
Figur 25 - Konsentrasjon av etiokolanolon før og etter injeksjon av testosteron enantat

Figur 24 og Figur 25 illustrerer at konsentrasjonen av etiokolanolon generelt endret seg lite under gelapplisering, men økte etter injeksjon. Gruppen med *ins/ins*-genotype viser signifikant økning fra baseline ( $P < 0.001$ ).

## DHT



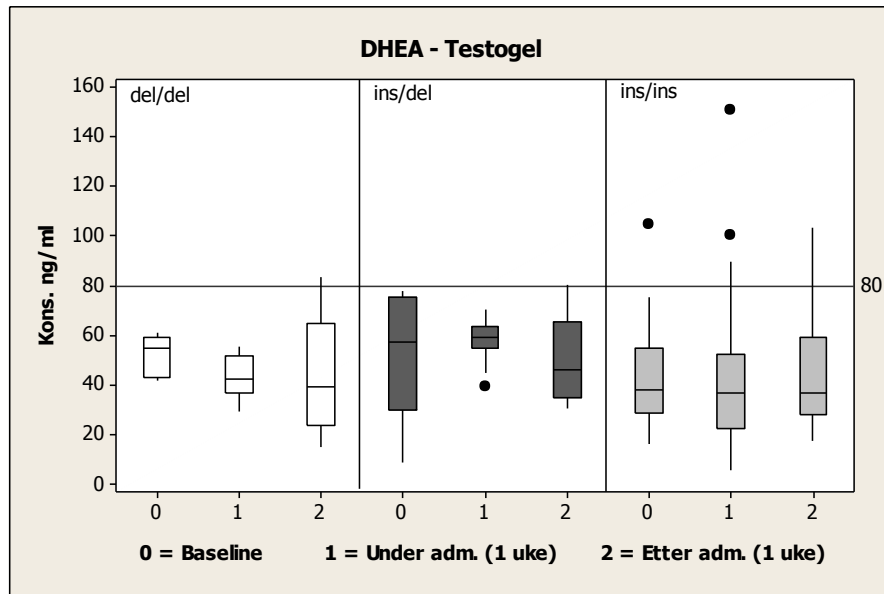
Figur 26 - Konsentrasjon av DHT før, under og etter gelapplisering



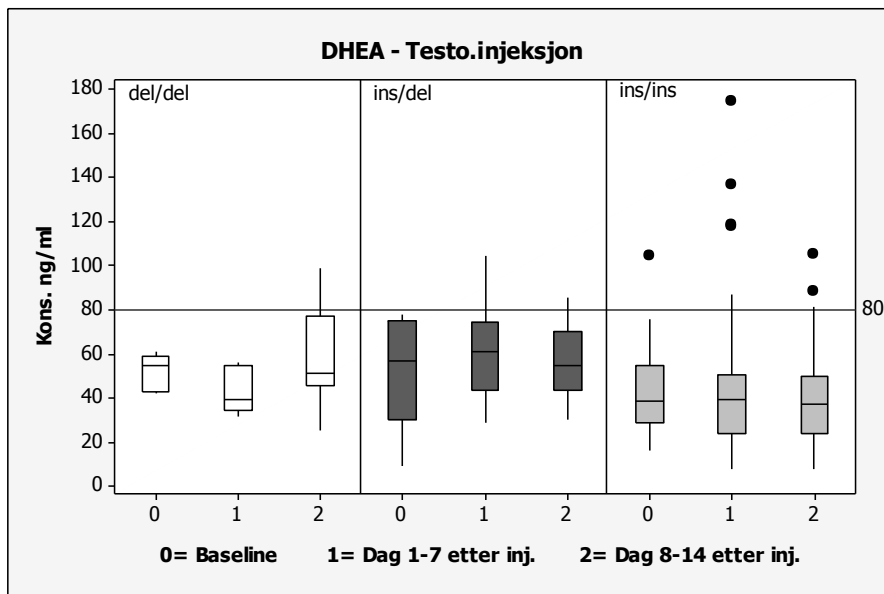
Figur 27 - Konsentrasjon av DHT før og etter injeksjon av testosteron enantat

DHT ble utskilt i meget lave konsentrasjoner, som vist i Figur 26 og Figur 27. Enkelte målinger var under laveste konsentrasjon for kalibreringskurven, som er 2 ng/ml. Gruppen med *ins/ins*-deltagere ser ut til å respondere mest på testosterontilførsel, da DHT-utskillelse økte signifikant etter tilførsel av testosteron både i gel- og injeksjonsform ( $P < 0.001$ ). *Ins/del*-gruppen viste signifikant økning i DHT etter testosteroninjeksjon ( $P = 0.033$ ).

## DHEA



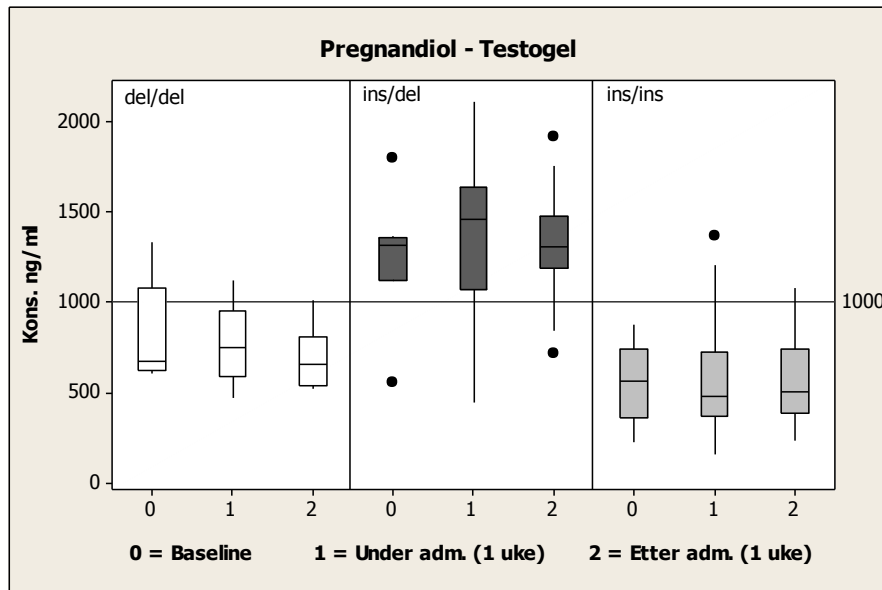
Figur 28 - Konsentrasjon av DHEA før, under og etter gelapplisering



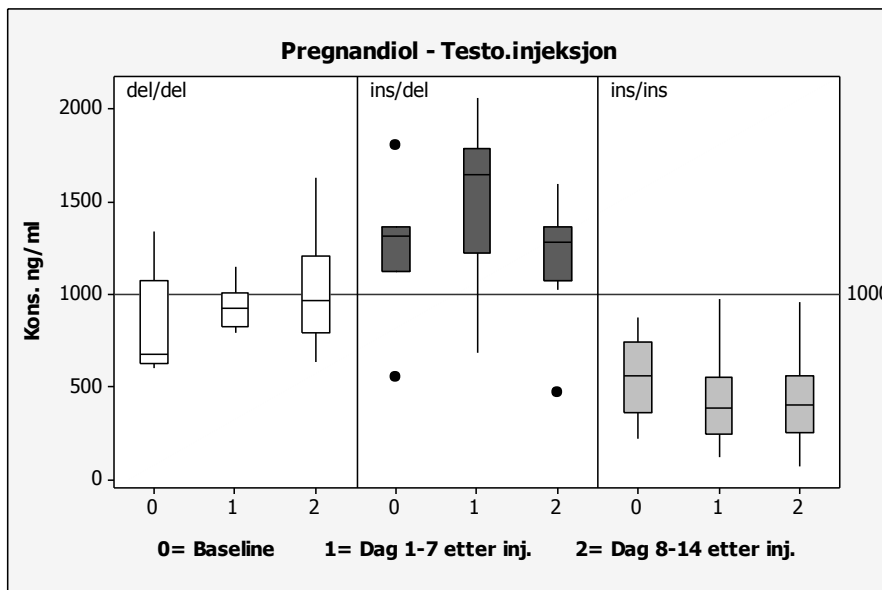
Figur 29 – Konsentrasjon av DHEA før og etter injeksjon av testosteron enantat

Figur 28 og Figur 29 viser et relativt jevnt nivå mellom de ulike genotypene og heller ikke de store endringene i urinutskillelse av DHEA etter tilførsel av testosteron. Da DHEA er en forløper for testosteron, var dette heller ikke å forvente.

## Pregnandiol



Figur 30 - Konsentrasjon av pregnandiol før, under og etter gelapplisering



Figur 31 - Konsentrasjon av pregnandiol før og etter injeksjon av testosteron enantat

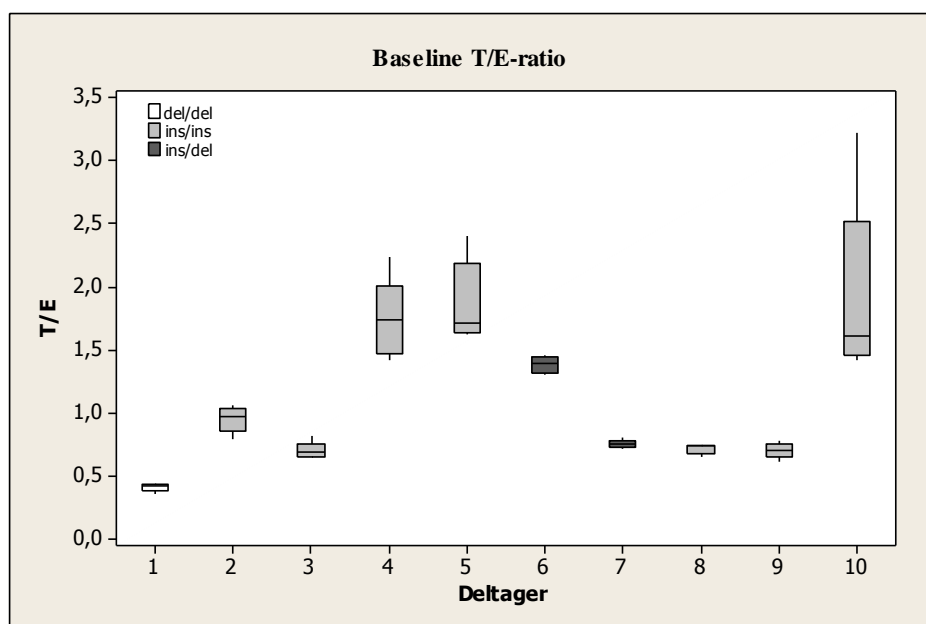
Både Figur 30 og Figur 31 viser at de to individene med *ins/del*-genotype hadde store variasjoner i utskillelsen av pregnandiol under gel- og injeksjonsperioden. Disse to deltagerne hadde generelt en noe høyere utskillelse av pregnandiol enn øvrige gruppene. Ellers vises liten endring i løpet av de ulike periodene.



### 4.2.3 T/E-ratio

#### Baseline T/E-ratio

Det ble beregnet gjennomsnittlig T/E-ratio for hver deltager ved analyse av urinprøver tatt fem sammenhengende dager i forkant av studien (blankperioden). Deltager 8 leverte ikke prøve for dag 5. Figur 32 viser at det var relativt store inter-individuelle variasjoner i baseline T/E-ratio. De fleste deltagerne viste svært liten intra-individuell variasjon, mens deltager 4,5 og 10 viste noe større variasjon.



Figur 32 - Gjennomsnittlig T/E-ratio for deltagerne i blank periode, basert på fem prøver.

Videre var det deltager 1 (*del/del*) som viste den laveste gjennomsnittlige T/E-verdien. Verdiene er imidlertid ikke mye lavere enn deltager 3-,7-,8- og 9 (*ins/del* og *ins/ins*). Plottet viser også at *ins/del*-deltagerne ikke skiller seg nevneverdig fra deltagerne med *ins/ins*. Fire deltagerne med genotype *ins/ins* har for eksempel T/E-gjennomsnitt som ligger under deltager 6 (*ins/del*).

#### Intra-individuelle variasjoner i T/E-ratio

Tabell 13 viser det prosentvise avviket fra den beregnede gjennomsnittlige T/E-verdien for hver av de fem blanke prøvedagene, det vil si den intra-individuelle variasjonen. Prøvene fra deltager 4 og 5 for henholdsvis dag 3 og dag 2 viser begge en verdi som ligger nært opp til 30

## Resultater

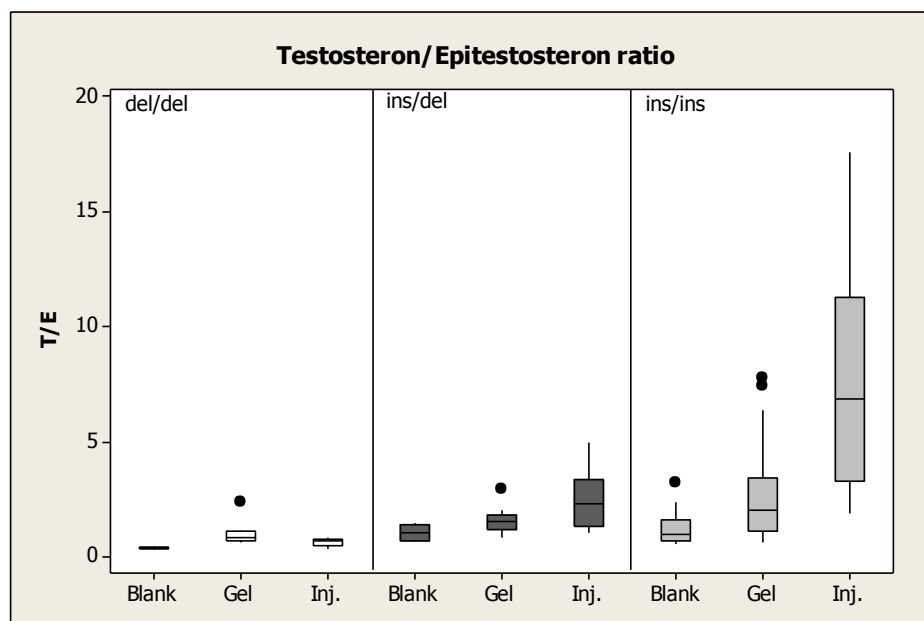
% . Deltager 10 viser på dag 5 en verdi som ligger hele 68,9 % fra gjennomsnittsratioen til denne deltageren. De tre nevnte deltagerne var forøvrig de som hadde høyeste gjennomsnittlige T/E-ratio. Generelt sett var de intra-individuelle variasjonene for størstparten av deltagerne < 15 % (41 av 49 prøver).

**Tabell 13 - Prosentvis avvik fra gjennomsnittlig T/E-verdi for hver prøvedag i blankperiode**

Prøvedag (blank)	Deltager									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	2,8	-16,4	16,1	-18,6	5,5	-6,1	2	3,2	-12,0	-5,1
2	-1,5	-3,3	-7,5	-12,8	28,5	-4,0	5,8	2,9	4,5	-25,7
3	3,4	12,5	-5,6	28,7	-12,2	0,9	-0,5	-9,3	-0,4	-22,5
4	-11,8	2,1	-0,2	2,2	-13,1	3,4	-1,0	3,3	11,5	-15,6
5	7,1	5,1	-2,7	0,5	-8,8	5,8	-6,2		-3,6	68,9
Gj.snitt baseline T/E-ratio	0,41	0,94	0,70	1,73	1,87	1,38	0,75	0,71	0,70	1,91

### T/E-ratio etter tilførsel av testosteron

Boksplottet i Figur 33 sammenligner T/E-ratio for de tre ulike genotypene i de ulike fasene av studien; blankperioden, under gelapplisering og etter injeksjon. Boksene for gel og injeksjon viser kun for de syv dagene gelappliseringen pågikk, og for syv dager etter injeksjonen. Dette fordi den største effekten og differensen fra baselineverdiene ble sett disse dagene.

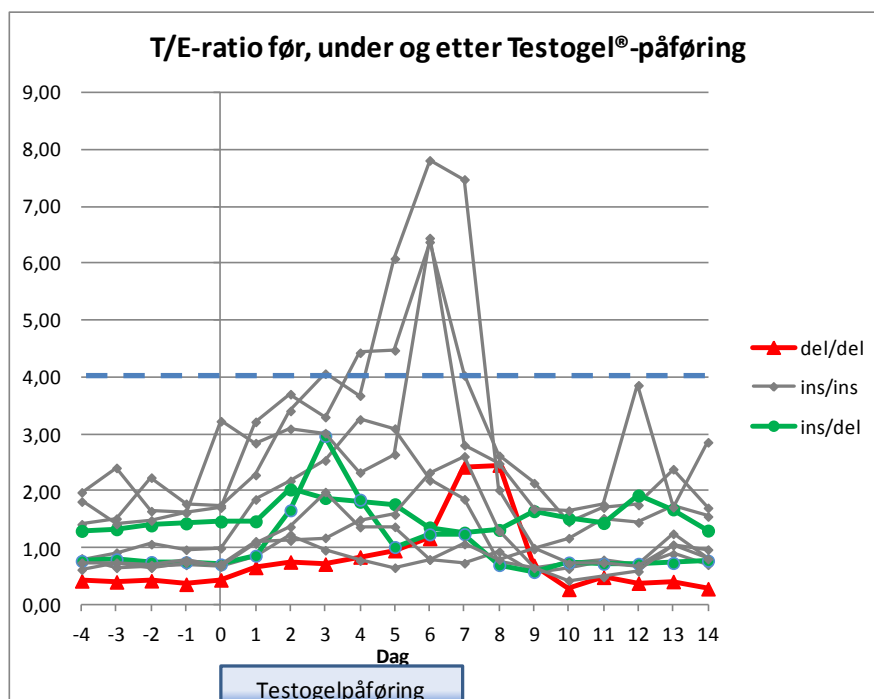


**Figur 33 – T/E-ratio under blankperiode, gelapplisering og etter injeksjon**

## Resultater

Deltagerne med genotype *ins/del* og *ins/ins* hadde, som figuren viser, relativt likt baselinenivå, og begge grupper er signifikant høyere enn *del/del* ( $P < 0.001$ ). Figuren viser tydelig at responsen på T/E-ratio for de fleste deltagerne var høyest etter intramuskulær injeksjon av testosteron enantat. Også i perioden med gelapplisering økte T/E-ratio for alle de tre gruppene. Deltageren med *del/del*-genotype hadde større økning i T/E-ratio under gelapplisering enn etter injeksjon.

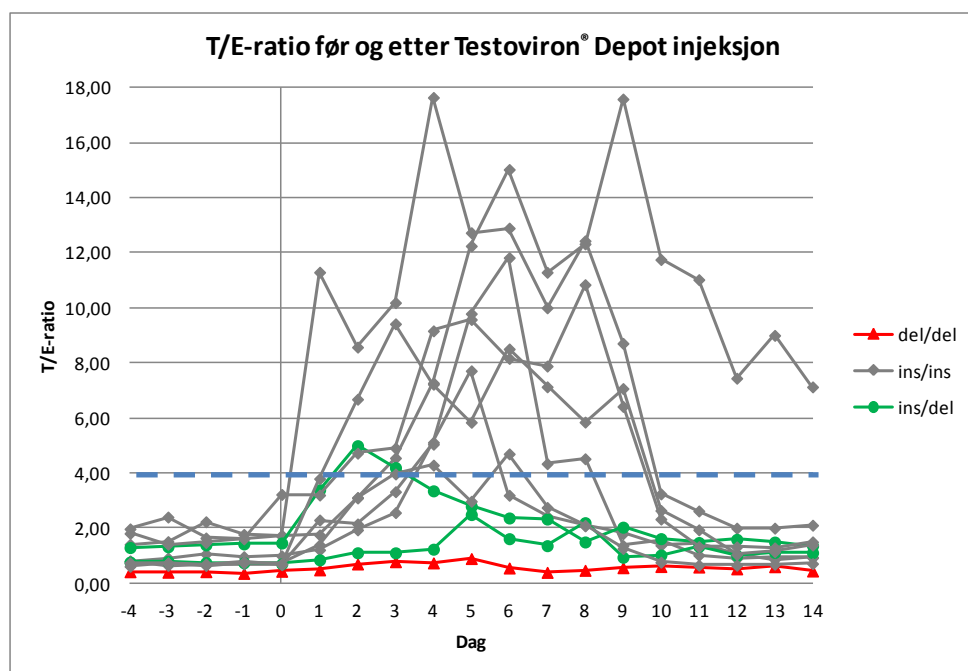
Figur 34 viser T/E-ratio for hver av de ti deltagerne i perioden før, under og etter påføring av Testogel (del 1 av studien). Grafen illustrerer at deltagerne hadde relativt stabile T/E-verdier i blankperioden før oppstart av Testogelperioden på dag 0. Deretter økte T/E-ratio for et flertall av deltagerne gradvis utover uken med Testogelpåføring. Det var kun tre av deltagerne som overskred WADA's reaksjonsgrense på  $T/E > 4$ . Den høyeste T/E-verdien som ble detektert var nært opptil 8. Gruppen med intakte alleler av UGT2B17 (*ins/ins*) viste relativt stor inter-individuell variasjon. Grafen illustrerer at deltager 1 med homozygot delesjon (*del/del*) viste de laveste T/E-verdiene under store deler av studiens del 1.



Figur 34 - T/E-ratio til hver av deltagerne i del 1 av studien, det vil si Testogel-perioden. Dag -4 til dag 0 viser baselineverdiene før Testogel® ble påført fra dag 0. Gelapplisering ble avsluttet på dag 7.

## Resultater

Figur 35 viser analyseresultatene for de enkelte deltagerne i del 2 av studien, hvor deltagerne fikk en injeksjon av Testoviron® Depot på dag 0. Grafen viser at T/E-verdiene for de fleste deltagerne begynte å stige raskt etter administrasjon av Testoviron Depot. Deltagerne oppnådde stort sett de høyeste T/E-verdiene i løpet av dag 4 til dag 6 post-administrasjon. T/E-ratio normaliserte seg fra dag 10 for alle deltagerne utenom en (deltager 4). Grafen illustrerer tydelig at det var store inter-individuelle variasjoner i utslag på T/E-ratio etter intramuskulær injeksjon av testosteron. Figuren viser at 8 av 10 deltagere hadde T/E-ratio over cut-off verdien på 4 i løpet av prøvetakingsperioden. Det høyeste målte T/E-ratio i del 2 av studien var oppunder 18. Figuren illustrerer tydelig at det totalt sett var svært mange av urinprøvene som hadde T/E-ratio > 4 etter injeksjon av testosteron enantat. Tabell 14 viser en oversikt over antall prøver per deltager som oversteg cut-off verdien på 4 i både del 1 og del 2 av studien. Totalt var det 5 prøver i studiens del 1 som overskred denne verdien, mens det i del 2 var hele 44 prøver.



Figur 35 - T/E-ratio til hver av deltagerne i del 2 av studien, det vil si Testoviron® Depot injeksjon. Dag -4 til dag 0 viser baselineverdiene før injeksjonen ble satt på dag 0.

De to deltagerne med heterozygot delesjon (*ins/del*) hadde generelt beskjeden stigning i T/E-ratio i forhold til flertallet av deltagerne med intakte alleler (*ins/ins*) av UGT2B17. Deltager 1 med homozygot delesjon (*del/del*) hadde nærmest ingen utslag på T/E-ratio, noe Figur 35 tydelig viser.

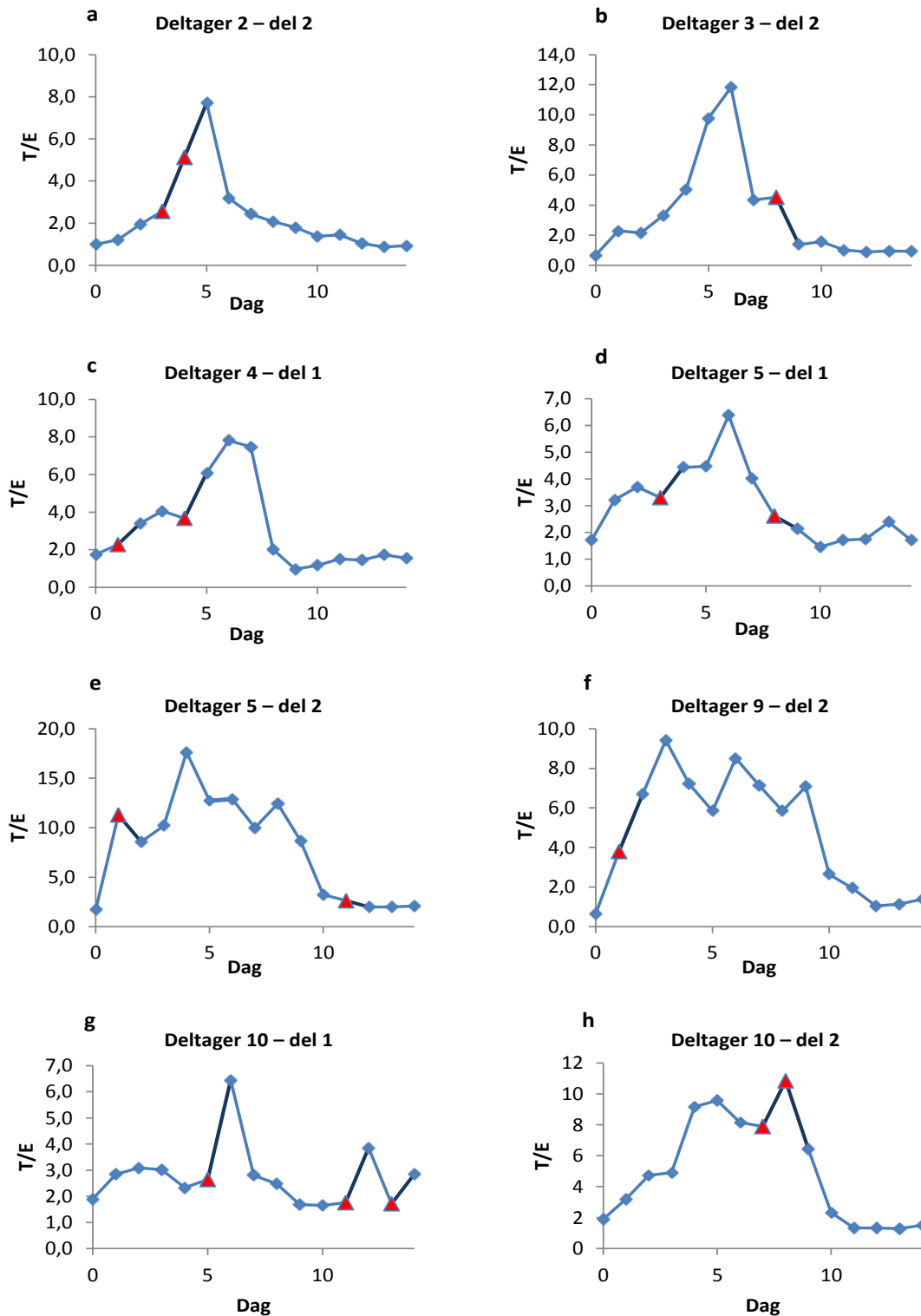
Tabell 14 – Oversikt over antall prøver per deltager som oversteg cut-off verdi (T/E &gt; 4)

Deltager	UGT2B17 genotype	Testogel antall prøver med T/E > 4	Testoviron antall prøver med T/E > 4
1	<i>del/del</i>	0	0
2	<i>ins/ins</i>	0	2
3	<i>ins/ins</i>	0	4
4	<i>ins/ins</i>	4	9
5	<i>ins/ins</i>	4	9
6	<i>ins/del</i>	0	2
7	<i>ins/del</i>	0	0
8	<i>ins/ins</i>	0	2
9	<i>ins/ins</i>	0	8
10	<i>ins/ins</i>	1	8

### T/E-ratio etter inntak av alkohol

Flere av deltagerne rapporterte inntak av alkohol i løpet av studieperioden. I Figur 36 illustreres disse deltagernes T/E-ratio for den delen av studien der det ble rapportert alkoholbruk. Dagene det ble inntatt alkohol på er markert med rød trekant i figuren. En effekt vil eventuelt ses påfølgende dag, markert med mørk strek. De ulike grafene viser at endringen i T/E-ratio dagen etter inntak av alkohol varierte mellom de ulike deltagerne. I noen tilfeller økte T/E-ratio i ulik grad, mens det i andre tilfeller sank. De mest markante endringene ble observert for deltager 2 (graf a) og deltager 10 (graf g).

## Resultater

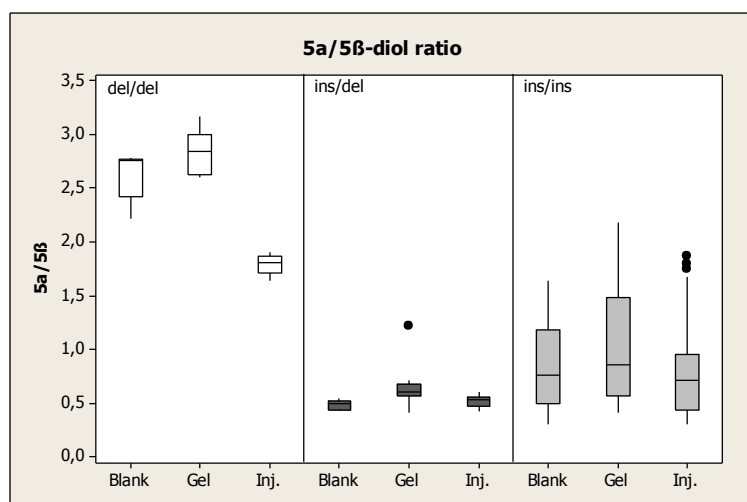


Figur 36 - Rapporterte inntak av alkohol hos (a) deltager 2, (b) deltager 3, (c) deltager 4, (d + e) deltager 5, (f) deltager 9 og (g + h) deltager 10. Rød trekant markerer alkoholkonsum samme dag.

#### 4.2.4 Ratio av utvalgte analytter

I tillegg til T/E-ratio, som er mest brukt i dopingsammenheng, kan forholdet mellom andre analytter være interessante å se på som potensiell markør for testosteronmisbruk. Da denne studien har benyttet lave doser testosteron, er det først og fremst hovedmetabolittene til testosteron det vil være mest aktuelt å se på.

##### 5 $\alpha$ -diol/5 $\beta$ -diol

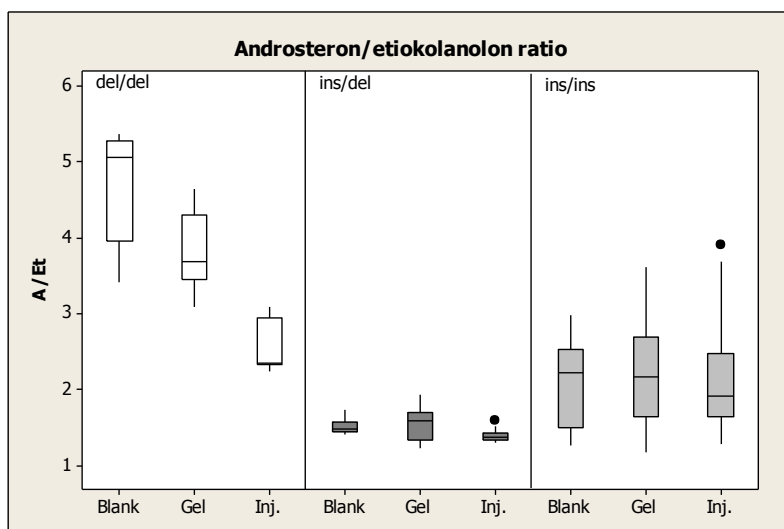


Figur 37 - 5 $\alpha$ -diol/5 $\beta$ -diol-ratio under blankperiode, gelapplisering og etter injeksjon

Figur 37 viser forholdet mellom testosteronmetabolittene 5 $\alpha$ -diol/5 $\beta$ -diol for de ulike genotypene. Figuren viser at andelen 5 $\alpha$ -diol under gelpåføring var noe større enn i blankperioden og i uken etter administrasjon av injeksjon.

##### Androsteron/etiokolanolon

Figur 38 viser at androsteron/etiokolanolon-ratio endret seg lite for genotypene *ins/del* og *ins/ins* under studieperioden. *del/del*-deltageren viste en relativ høy intra-individuell variasjon i forholdet.



Figur 38 - Androsteron/etiokolanolon-ratio under blankperiode, gelapplisering og etter injeksjon

#### 4.2.5 Analyse ved IRMS

Det ble av hensyn til tid og kapasitet besluttet at det til denne oppgaven skulle kjøres IRMS-analyse på utvalgte prøver fra noen av deltagerne. Til analysen ble det plukket ut prøver fra blankperiode og prøver som skulle være representative for de ulike delperiodene i studien. Utvelgelsen var uavhengig av T/E-verdi. Deltager 1 med homozygot delesjon i UGT2B17-genet (*del/del*) var naturlig å inkludere, da vedkommendes prøver viste svært lave nivåer av testosteron og var langt under cut-off verdien på  $T/E > 4$ . I tillegg ble prøver fra deltager 5 (*ins/ins*) og 9 (*ins/ins*) analysert.

Det ble analysert for følgende steroider: testosteron,  $5\alpha$ -diol,  $5\beta$ -diol, androsteron, etiokolanolon og DHEA. Sistnevnte er en forløper for testosteron, og det ble ikke funnet endring i  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -forholdet til dette stoffet. Resultatene nedenfor er utarbeidet med pregnandiol som ERC, altså referansesteroid.  $5\alpha$ -diol er utelatt på grunn av tekniske problemer med analysemetoden. Analyseresultater med deltaverdier over 3 i forhold til ERC, er skrevet i rød skrift for å markere bekreftelse på funn av stoff med eksogent opphav. I de tilfellene der det ikke er oppgitt noen verdi ( $< \text{LOD}$ ), kommer det av at konsentrasjonen av analytten i prøven var for liten til at det var mulig å foreta en adekvat analyse.



## Resultater

Tabell 15 –  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  verdier i prøver fra deltager 1 (*del/del*)

Deltager 1 ( <i>del/del</i> ) - Testogel applikasjon				
Prøve	Testosteron $\Delta\delta$ (‰)	5 $\beta$ -diol $\Delta\delta$ (‰)	Androsteron $\Delta\delta$ (‰)	Etiokolanolon $\Delta\delta$ (‰)
Dag 0	< LOD	0,6	< LOD	0,9
Dag 1	< LOD	1,3	< LOD	1,2
Dag 2	4,5	2,0	0,3	2,0
Dag 3	4,1	1,6	< LOD	1,2
Dag 6	5,4	2,6	0,6	1,9
Dag 8	5,0	2,9	1,2	2,0
Dag 10	< LOD	3,0	0,2	1,2

For deltager 1 kan det i Tabell 15 observeres testosteron av eksogent opphav ( $\Delta\delta > 3$  ‰) etter to dager med gelapplisering og frem til dag 8. 5 $\beta$ -diol oversteg grensen på 3 ‰ først på dag 10, tre dager etter siste gelpåføring. For androsteron og etiokolanolon kan det ikke påvises eksogent opphav på grunnlag av analyseresultatene.

Tabell 16 –  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  verdier i prøver fra deltager 1 (*del/del*)

Deltager 1 ( <i>del/del</i> ) - Testosteron injeksjon			
Prøve	Testosteron $\Delta\delta$ (‰)	5 $\beta$ -diol $\Delta\delta$ (‰)	Androsteron $\Delta\delta$ (‰)
Dag 0	< LOD	0,6	< LOD
Dag 1	4,5	1,3	0
Dag 2	< LOD	2,5	0,4
Dag 3	3,0	3,8	1,9
Dag 4	< LOD	5,0	0,7
Dag 5	5,1	4,2	1,1
Dag 6	4,4	2,9	0,5
Dag 7	< LOD	1,6	0,4

Tabell 16 viser at det for deltager 1 ble detektert testosteron og 5 $\beta$ -diol av eksogent opphav ( $\Delta\delta > 3$  ‰) fra henholdsvis dag 1 og dag 3 etter injeksjon. Androsteron ble tilsynelatende lite påvirket av testosterontilførsel og oversteg ikke en  $\Delta\delta$ -verdi på 3 ‰ på noe tidspunkt.

## Resultater

Tabell 17 –  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  verdier i prøver fra deltager 5

Deltager 5 ( <i>ins/ins</i> ) - Testogel applikasjon			
Prøve	Testosteron $\Delta\delta$ (‰)	5 $\beta$ -diol $\Delta\delta$ (‰)	Androsteron $\Delta\delta$ (‰)
Dag 0	1,4	0,8	0
Dag 1	2	1,0	0
Dag 3	1,9	1,0	0
Dag 6	4,9	3,5	1,5
Dag 8	4,6	3,2	0,9
Dag 10	1,0	1,0	0

Deltager 5 hadde, som Tabell 17 viser, tilstrekkelig høye verdier av testosteron og 5 $\beta$ -diol i to av dagene under gelperioden, til at eksogent opphav kan bekreftes.

Tabell 18 —  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  verdier i prøver fra deltager 9

Deltager 9 ( <i>ins/ins</i> ) - Testogel applikasjon				
Prøve	Testosteron $\Delta\delta$ (‰)	5 $\beta$ -diol $\Delta\delta$ (‰)	Androsteron $\Delta\delta$ (‰)	Etiokolanolon $\Delta\delta$ (‰)
Dag 0	0,6	0,7	0	1,2
Dag 2	3,1	2,4	0,6	1,6
Dag 3	4,5	2,0	0,3	2,0
Dag 5	4,1	1,6	< LOD	1,2
Dag 9	5,4	2,6	0,6	1,9

Tabell 19 –  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  verdier i prøver fra deltager 9

Deltager 9 ( <i>ins/ins</i> ) - Testosteron injeksjon				
Prøve	Testosteron $\Delta\delta$ (‰)	5 $\beta$ -diol $\Delta\delta$ (‰)	Androsteron $\Delta\delta$ (‰)	Etiokolanolon $\Delta\delta$ (‰)
Dag 0	0,6	0,7	0	1,2
Dag 3	4,6	4,6	3,0	4,1
Dag 5	4,8	4,1	2,3	3,6
Dag 6	6,2	5,3	3,5	4,3
Dag 8	4,5	4,5	3,1	3,3
Dag 10	3,0	3,1	0,8	2,7

Tabell 18 og Tabell 19 viser at det for deltager 9 var atskillig flere verdier som oversteg  $\Delta\delta$ -verdien på 3 ‰ etter testosteroninjeksjon enn ved geladministrasjon. Dette var også tilfelle for 5 $\beta$ -diol, androsteron og etiokolanolon.

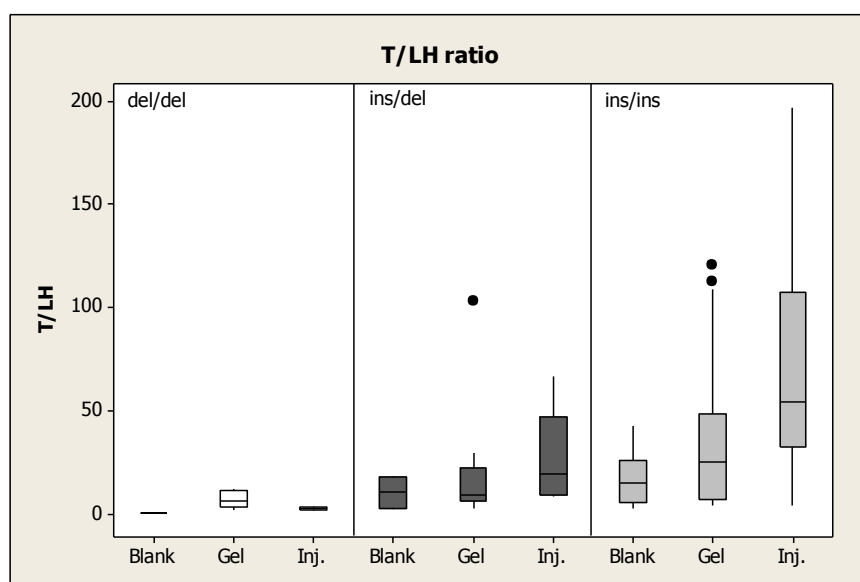
#### 4.2.6 Analyse av LH ved fluoroimmunoassay

Av kapasitetshensyn ble det ikke utført LH-analyse på mer enn 100 prøver. Det ble besluttet at 10 prøver fra hver deltager skulle tas med. En prøve fra blankperioden, fem prøver fra del 1 i studien (gelperioden), samt fire prøver fra del 2 (injeksjonsperioden) ble analysert. Det ble fra del 1 og del 2 valgt prøver fra de dagene med erfaringsmessig høyest T/E-ratio, henholdsvis dag 3-7 med gel og dag 1-4 etter injeksjon. Tabell 20 viser gjennomsnittsverdiene av LH for de ulike deltagerne.

**Tabell 20 – Gjennomsnittlig LH-verdi (U/L), standard avvik i parentes**

Deltager	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Blank (n=1)</b>	6,2	5,7	3,0	1,4	3,3	10,1	2,1	2,4	10,3	2,2
<b>Gel (n=5)</b>	2,2 (1,2)	5,7 (3,1)	5,8 (2,2)	0,6 (0,2)	1,2 (0,4)	3,1 (2,3)	5,2 (4,7)	2,5 (0,9)	4,7 (0,6)	2,0 (0,6)
<b>Inj. (n=4)</b>	3,1 (1,1)	6,0 (3,0)	4,8 (3,2)	0,8 (0,3)	1,6 (1,0)	3,2 (2,3)	4,4 (2,3)	2,6 (1,4)	2,9 (1,0)	1,3 (1,2)

Boksplottene i Figur 39 viser den generelle endringen i T/LH-ratio for de ulike genotypene. For *ins/del* og *ins/ins* observeres en økning i ratio både under Testogelpåføring og etter injeksjon av testosteron enantat.



**Figur 39 - T/LH-ratio for prøver tatt fra blankperiode, under gelapplisering og etter injeksjon**

## Resultater

## 5 Diskusjon

### 5.1 Prøveresultater

#### 5.1.1 Konsentrasjon av analyttene

I denne studien ble det screenet for følgende 13 substanser: testosteron, epitestosteron, 5 $\alpha$ -androstadiol, 5 $\beta$ -androstadiol, 6 $\beta$ -OH-androsteron, 6 $\beta$ -OH-etikolanolon, androsteron, etikolanolon, DHT, DHEA, 11 $\beta$ -OH-androsteron, 11 $\beta$ -OH-etikolanolon og pregnandiol. Boksplottene for konsentrasjon av de ulike steroidene, viser generelt få ulikheter mellom genotypene *ins/del* og *ins/ins* i utskillelse av testosteron og testosteronmetabolitter. Deltageren med *del/del*-genotype viste svært lav utskillelse av testosteron, og utskillelsen av epitestosteron, 5 $\beta$ -diol, etikolanolon samt 6 $\beta$ -OH-steroidene lå på nivå med de laveste verdiene blant *ins/del*- og *ins/ins*-deltagerne. Ellers ser det ut til at de øvrige analyttene ble skilt ut i relativ lik grad for de tre genotypene.

Det er kjent at tilførsel av testosteron kan undertrykke den endogene produksjonen. Figur 6 og Figur 7 viser en svak tendens til at testosteronkonsentrasjonen i siste periode (dag 7-14) av del 1 og 2 er noe lavere enn baseline. Endringene er ikke signifikante, men kan antyde at testosterondoseringen har vært høy nok til at egenproduksjonen av testosteron ble noe undertrykket. Det er tidligere vist at eksogent testosteron også reduserer urinutskillelse av epitestosteron på grunn av suppresjon av LH-sekresjon [60, 61]. Figur 8 og Figur 9 viser en svak tendens til at utskillelsen ble redusert under begge deler av studien.

#### 5.1.2 T/E-ratio

Ifølge dagens gjeldende retningslinjer for dopingkontroll skal urinprøver med T/E-ratio som overskrider cut-off verdien på 4 undersøkes nærmere [22]. Dette betyr at prøveresultatene i denne studien ideelt sett burde overskride denne verdien, til tross for lavdose testosterontilførsel. Det finnes begrensede data med hensyn til hvilke doser av AAS som benyttes av idrettsutøvere i dopingsammenheng. Det er kjent at kroppsbyggere inntar AAS i sykluser som varer 4-12 uker, noe som er vist å være fordelaktig. Dosene varierer fra 250 mg til 3500 mg i uken, noe som er opp til nesten 40 ganger høyere enn anbefalte terapeutiske doser [38]. I denne studien ble det i del 1 administrert 50 mg Testogel daglig, og i del 2 gitt en

125 mg intramuskulær injeksjon. Det antas dermed ikke at dosene som ble brukt i studien er høye nok til å gi en prestasjonsfremmende effekt. Det er imidlertid flere ganger foreslått at administrasjon av små doser AAS, og spesielt testosteron, også i restitusjonsperioder kan være interessant i doping øyemed. Det var derfor av interesse for oppgaven å undersøke deteksjonsgraden av så lave doser. Inntak av små doser AAS kan muligens gi mindre utmattelse og raskere restitusjon, noe som igjen kan gi økt treningskapasitet og på den måten være prestasjonsfremmende [38].

Det var i forkant av studien knyttet noe usikkerhet til hvorvidt dosene som ble administrert til forsøkspersonene var høye nok til å kunne detektere eventuelle endringer i urinutskillelse av testosteronmetabolittene. Dette gjaldt spesielt for administrasjon av Testogel transdermalt. Studien demonstrerte at transdermal administrasjon av 50 mg testosteron daglig var høy nok dose til at det ble sett ulik grad av utskillelse ved hjelp av GC-MS metoden. Som Tabell 14 viser var det imidlertid kun 9 av totalt 70 analyserte urinprøver fra da deltagerne daglig påførte Testogel, som overskred reaksjonsgrensen på T/E-ratio  $> 4$ . Dette betyr at det vil være relativt liten sjanse for å oppdage tilførsel av testosteron i små, daglige doser, noe som muliggjør misbruk av lavdose testosteron i restitusjonsperioder. Samme tabell viser derimot at 44 av prøvene fra injeksjonsperioden overskred grensen på 4. Dette illustrerer at det vil være vanskeligere å misbruke testosteron administrert som injeksjon i doser av denne størrelsesordenen.

Det har lenge vært kjent at T/E-ratio hos de fleste kaukasiske menn og kvinner normalt sett ligger rundt 1-2 [18] og at naturlige intra-individuelle variasjoner ikke er større enn 30 % [22]. Det er imidlertid vist at det kan forekomme tilfeller med naturlig høy T/E ratio over 6 [20, 21]. Tidligere studier har demonstrert at spesielt en stor andel asiater viser signifikant lavere T/E-ratio enn dagens reaksjonsgrense på 4 også etter tilførsel av testosteron [23]. Det er i senere tid etablert en sammenheng mellom lave T/E-verdier og en genetisk variasjon i ett enzym som UGT2B17-genet koder for, og som er sentral i utskillelsen av testosteron [24]. Det er fastslått at homozygot delesjon (*del/del*) i UGT2B17-genet forekommer mye oftere hos asiater enn kaukasiere, henholdsvis rundt 70 % mot 10 % [28, 30]. Genotyping av de ti kaukasiske forsøkspersonene i denne studien kunne påvise at én av deltagerne hadde *del/del* genotype. Studien er dermed en videre bekreftelse på at forekomsten av homozygot delesjon *del/del* er rundt 10 % i den kaukasiske populasjon. Tabell 12 viser at alle de ti

studiedeltagerne hadde gjennomsnittlig T/E-ratio ("baseline T/E") under 2 i blankperioden, og lå dermed innenfor normalområdet [14, 18].

Deltagernes intra-individuelle variasjoner, angitt i prosentvis avvik fra deltagerens gjennomsnittlige T/E-ratio i blankperioden, er vist i Tabell 13. Av de ti deltagerne hadde en av dem, deltager 10, høyere intra-individuell variasjon i blankprøvene enn den foreslåtte maksimalgrensen på 30 % [22]. Denne ene urinprøven hadde T/E-ratio på 3.2, det vil si 68,9 % over gjennomsnittlig T/E-verdi for denne deltageren basert på de fem blankprøvene. Årsaken til den høye verdien vites ikke, og det kan ikke utelukkes at det foreligger en feil i forbindelse med prøveopparbeidelse og estimering av verdiene. Verdien ble ikke definert som uteligger i boksplokk for deltager 10 i Figur 32. Den samme verdien er imidlertid markert som uteligger når *ins/ins*-deltagerne ses under ett i Figur 33. Det ble likevel valgt å inkludere prøven i tallmaterialet. Det bør nevnes at prøven viste lav spesifikk vekt, og at konsentrasjonen av epitestosteron ligger nært deteksjonsgrensen. Prøven lå likevel under cut-off verdien og ville antagelig ikke blitt ansett som mistenkelig i dopinganalyse.

Da T/E-ratio er den mest brukte parameteren i dopingkontroll var det spesielt av interesse å undersøke hvordan T/E-verdiene hos de ti forsøkspersonene ble påvirket av eksogen testosterontilførsel ved de to ulike administrasjonsformene. Figur 34 illustrerer T/E-ratio til hver av deltagerne før, under og etter påføring av Testogel<sup>®</sup>. Grafen viser en generell trend med en relativ stabil innledende fase før påføring. T/E-ratio for et flertall av deltagerne økte deretter gradvis fra dag 0 utover i uken med Testogelpåføring. Det var kun tre av deltagerne som overskred WADA's reaksjonsgrense på  $T/E > 4$ . Innad i gruppen med intakte alleler av UGT2B17 (*ins/ins*) var det relativ stor variasjon mellom deltagerne. Noen av deltagerne fikk store utslag på T/E-ratio etter påføring av Testogel<sup>®</sup>, mens en av deltagerne viste liten endring på T/E-ratio. En mulig årsak til dette kan være *non-compliance* i forhold til påføringsrutinene beskrevet i flytskjemaet (appendiks 3) og pakningsvedlegget som ble utlevert ved oppstart av studiet. For eksempel vil påføring på feil kroppsområde eller dusjing/vasking for kort tid etter påføring kunne påvirke resultatet.

Det er spesielt verdt å merke seg at verdiene til deltageren med homozygot delesjon (*del/del*) var de laveste under store deler av perioden. Dette samsvarer med det man kunne forvente ut fra tidligere publisert litteratur om UGT2B17-genets relasjon til utskillelse av testosteronglukuronid [15, 24, 28].

Grafen som illustrerer T/E-verdiene til deltagerne etter injeksjon av testosteron enantat (Figur 35), viser store variasjoner innad i gruppen med homozygot intakt variant av UGT2B17 (*ins/ins*). Verdiene steg relativt raskt etter injeksjonen sammenlignet med gelperioden. I tillegg er toppverdiene vesentlig større, og antallet prøver som overskred cut-off verdien på 4 er atskillig høyere enn tilfellet var med Testogel®. Totalt sett var det kun to av deltagerne som ikke nådde cut-off verdi  $> 4$  etter injeksjon av testosteron. For de to deltagerne med heterozygot delesjon (*ins/del*) observeres en viss stigning i T/E-ratio for den ene, men generelt beskjedent i forhold til flertallet av deltagerne med intakte alleler (*ins/ins*) av UGT2B17. Med ett intakt allel av UGT2B17-genet var det å forvente at deltagerne med heterozygot delesjon (*ins/del*) ville vise noe lavere utskillelse enn deltagerne med genotype *ins/ins*. I del 2 av studien vises det enda tydeligere at deltageren med homozygot delesjon (*del/del*) skiller seg markant fra de andre deltagerne med kun neglisjerbar endring i T/E-ratio etter tilføring av testosteron. Denne deltagerens T/E-verdier var stabile under hele prøvetakingsperioden. Som Figur 33 viser, hadde denne deltageren større økning i T/E-ratio under gelapplisering enn etter injeksjon. Grunnen til dette er uvisst, men det må igjen påpekes at utskillelsen av testosteronglukuronid generelt var svært lav hos denne deltageren.

Tabell 14 illustrerer tydelig at det var et mye høyere antall prøver med verdier over WADA's reaksjonsgrense på  $T/E > 4$  i del 2 av studien, der deltagerne hadde fått injisert testosteron. Tabellen viser at det i del 1 av studien kun var 9 prøver som overskred cut-off verdien, mens det i del 2 var hele 44 "mistenkkelige" prøver. Dette var også forventet da intramuskulær injeksjon har svært høy biotilgjengelighet, sammenlignet med et gelpreparat (9-14 % for Testogel) [40].

På bakgrunn av disse resultatene, kan det konstateres at deltageren med homozygot delesjon i UGT2B17-genet (*del/del*), neppe ville blitt oppdaget i en dopingkontroll med testosterondosene brukt i denne studien. Dette stemmer overens med en tidligere studie som konkluderer med at dette vil gjelde en stor andel av individer med denne genotypen [24]. Av de øvrige deltagerne var det også en annen deltager (*ins/del*) som ikke oversteg en T/E-verdi på 4 i løpet av hele studieperioden.

Det er tidligere publisert studier som har påvist at alkohol i store mengder kan påvirke T/E-ratioen [62, 63]. Figur 36 viser grafer for periodene der deltagerne hadde notert inntak av mer enn 2 alkoholenheter. Alle deltagere som deklarte alkoholkonsum var forøvrig homozygote bærere av intakte alleler (*ins/ins*) av UGT2B17-genet. Majoriteten av grafene tyder ikke på



store påvirkninger som kan tilskrives alkoholinntak. Deltager 2 (graf a) viste en bratt kurve etter dag 3 og 4, men en slik stigning er heller ikke utenkelig etter injeksjon av testosteron enantat. Den mest interessante observasjonen ses hos deltager 10 (graf g). Dagene med registrerte alkoholinntak viser påfallende økning i T/E-ratio dagen etter. Samme individ hadde en unormalt høy T/E-verdi på en av prøvene fra blankperioden (diskutert tidligere). En felles faktor for prøvene med høye T/E-verdier er også i dette tilfellet at urintettheten til prøvene er relativt lav. Ingen er forøvrig under grensen på 1.010, som krever et større prøveuttak (5 ml).

Falk *et al.* [63] demonstrerte i en studie at inntak av ca 2 g etanol per kilogram kroppsvekt kunne føre til en økning i T/E-ratio på 30 % - 90 %. I denne oppgavens forsøk ble de 10 deltagerne kun bedt om å oppgi dersom alkoholkonsumet var større enn 2 alkoholenheter, og ikke hvor mye som eventuelt ble inntatt. Sett i ettertid kunne det vært en fordel om mengde hadde blitt inkludert, for på den måten kunne sammenligne om resultatene i denne studien stemmer overens med tidligere studier. Det er likevel her vist at inntak av alkohol muligens kan ha en betydning for et prøveresultat, og dermed er viktig å ta med i betraktningen ved vurdering av atypiske funn, for eksempel fra prøver tatt utenfor konkurranse. Deltager 5 oppga bruk av Ibux gel 5 % på dag 3 i gelperioden (Figur 36, graf d). Samme dag ble det oppgitt inntak av alkohol. Dagen etter steg T/E fra 3,3 til 4,4, og deretter til 4,5 og 6,6 de to neste dagene. Da deltageren har inntatt alkohol, og dette er midt i gelperioden, er det derfor ikke mulig å slå fast om denne økningen skyldes bruk av Ibux eller ikke.

### 5.1.3 5 $\alpha$ -reduktaseaktivitet i huden

Tidligere studier har indikert at testosteron administrert gjennom huden i større grad blir konvertert til 5 $\alpha$ -metabolitter (DHT, 5 $\alpha$ -diol og androsteron) enn 5 $\beta$ -metabolitter ( $\beta$ -DHT, 5 $\beta$ -diol og etiokolanolon). Årsaken til dette er uttalt 5 $\alpha$ -reduktaseaktivitet i hud [64]. Det ble i denne studien funnet små mengder DHT, og i de fleste prøvene der det ble funnet en topp var den forstyrret av en interferens, noe som gjorde det vanskelig å bestemme arealet. Å sammenligne utskillelsen av DHT mellom de to ulike administrasjonsformene er derfor lite hensiktsmessig. Derimot kan forholdet mellom 5 $\alpha$ -diol og 5 $\beta$ -diol (Figur 37) illustrere at andelen 5 $\alpha$ -metabolitter økes ved transdermal administrasjon, i forhold til 5 $\beta$ -metabolittene. Denne sammenhengen vises imidlertid ikke tydelig av forholdet mellom androsteron/etiokolanolon (Figur 38). Dette kommer antagelig av at androsteron og etiokolanolon dannes fra flere forløpere enn 5 $\alpha$ -diol og 5 $\beta$ -diol. WADA anser disse ratioene

som potensielt nyttige markører. 5 $\alpha$ -reduktasehemmere som finasterid og dutasterid kan ha spesielt stor effekt på produksjon av disse steroidene [65].

### 5.1.4 IRMS-resultater

I tillegg til analyse av alle prøvene i studien ved GC-MS, ble det utført analyse ved IRMS for tre deltagere, deltager 1 (*del/del*), deltager 5 (*ins/del*) og deltager 9 (*ins/ins*). Hensikten med dette var å undersøke om IRMS kunne bekrefte eksogen tilførsel av lavdose testosteron. Deltager 1 hadde i utgangspunktet svært lave konsentrasjoner av testosteron og testosteronmetabolitter. IRMS-analysen hadde av den årsak problemer med å gi tilstrekkelig data som kan bekrefte eksogent tilført testosteron hos denne deltageren. Der det har vært tvil ble ”godviljen” brukt i forbindelse med tolkning og utarbeidelse av resultatene. Dersom en idrettsutøver i det hele tatt hadde vært mistenkt i en dopingsak med disse verdiene, er det nok sannsynlig at prøveresultatene hadde blitt rapportert som ”*inconclusive*” etter WADA's retningslinjer, det vil si for mangelfull til å være bevis på en positiv prøve.

Deltager 5 (Tabell 17) var den av de tre deltagerne som i IRMS-analysen oversteg en T/E-verdi på 4 i løpet av gelperioden. Likevel er det kun i siste del av perioden at testosteron- og 5 $\beta$ -diol-verdiene avviker med mer enn 3 deltaenheter fra pregnandiol, som ble brukt som ERC. På blant annet dag 3 var verdiene for lave til å påvise et eksogent opphav.

Deltager 9 hadde kun liten økning i T/E-ratio (maksimum: 2.0) og testosteronkonsentrasjon under perioden med gelapplikasjon. Likevel ble grensen på  $\Delta\delta > 3 \text{ ‰}$  overskredet for testosteron i alle prøvene fra gelperioden, som vist i Tabell 18. I injeksjonsperioden steg T/E-ratio atskillig mer, og eksogen tilførsel kan meget tydelig bekreftes, da alle analyttene viste verdier som overstiger grensen som regnes tilstrekkelig som bevis.

Resultatene fra IRMS-analysen tilsier at det kan være mulig å bekrefte tilførsel av eksogent testosteron til tross for lave doser.

### 5.1.5 LH-resultatene

I WADA's tekniske dokument står T/LH-ratio nevnt som et mulig supplement i en eventuell dopingsak, i og med at det kan ses et forhøyet forhold mellom disse stoffene. Det var derfor interessant å se om dette var tilfelle også i denne studien. Konsentrasjonen av LH sank for de

fleste av deltagerne i del 1 og del 2, med unntak av tre deltagere, se Tabell 20. I kombinasjon med økte testosteronnivåer førte dette til at T/LH-ratio generelt steg, som vist i Figur 39. Sett i ettertid kunne det muligens vært mer hensiktsmessig å fordele de 100 prøvene på færre deltagere, for å kunne se eventuelle endringer over tid og ha flere prøver å basere dette på. Tallmaterialet er for lite til å kunne konkludere for den enkelte.

## 5.2 Mulige feilkilder

Det finnes flere potensielle feilkilder ved denne typen forsøk, noe som er viktig å ta med i betraktningen.

Ekskresjonen av steroider i urin viser store individuelle variasjoner. Blant annet vil tidspunkt på døgnet for prøvetaking påvirke analyseverdiene, da testosteron produseres og utskilles i varierende grad. Deltagerne i denne studien ble bedt om å ta prøvene fortrinnsvis på morgenen, når testosteronkonsentrasjonen i kroppen normalt er på sitt høyeste. Det er både fordeler og ulemper ved å ta prøvene på samme tidspunkt. Ved å ta prøvene til samme tid hver dag vil konsentrasjonene av analyttene være mest mulig sammenlignbare. Samtidig vil det i forbindelse med dopingkontroller forekomme at urinprøver blir tatt til så og si alle tider på døgnet, og variasjonen i urinkonsentrasjonene kan eventuelt variere ytterligere av denne årsak.

Det ble i dette forsøket etablert referanseverdier på bakgrunn av prøver som var samlet fem sammenhengende dager i forkant av første administrering av testosteron. Det kan tenkes at den naturlige intra-individuelle variasjonen av steroidutskillelsen i urin ville komme sterkere til syne dersom prøvene skulle avgis over et større totalt tidsintervall enn disse fem dagene.

Studien baserer seg på at urinprøvene er oppbevart og behandlet tilfredsstillende frem til prøveopparbeidelse og analyse. Deltagerne fikk beskjed om å legge urinprøvene i fryser etter prøvetaking for å begrense mikrobiell kontaminering av prøvene. Det er tidligere vist at forskjellige mikroorganismer blant annet kan indusere hydrolyse av glukuronidkonjugater, og dermed påvirke steroidprofil [66]. Deltagerne skulle selv merke prøveflaskene med ferdigmerkede klistrelapper, noe som medfører en risiko for at prøver kan ha blitt feilmerket. Samme type feil kan finne sted etter opptining av prøver for videre overføring til alikvotglass før prøveopparbeidelse. I forbindelse med opptining vil enkelte stoffer i urinen krystallisere seg, og ved hensetting av prøver over lengre tid vil stoffer i urinen segmentere. Før overføring

til henholdsvis alikvotglass og slipglass er det derfor viktig at samtlige prøver har blitt tilstrekkelig rystet og blandet opp til homogen tilstand.

Deltagerne fikk ved studieoppstart instruksjoner om å notere eventuelt inntak av alkohol eller betennelsesdempende legemiddel, samt oppgi dersom prøvetaking foregikk sent på dagen. Det antas at eventuelle merknader på utlevert flytskjema ble notert, i de tilfeller det måtte være nødvendig. For deltagere som ikke innleverte skjema og merknader heller ikke muntlig ble overført, må det antas at intet var å tilføye. Det må likevel tas forbehold for at deltagere kan ha glemt eller unnlatt å føre opp opplysninger som kunne vært av interesse.

### 5.3 Fremtidig bruk av individuelle steroidprofiler

Bruk av individbaserte referansegrenser i dopinganalyse ble diskutert allerede tidlig på 1990-tallet. Donike *et al.* demonstrerte at individbaserte referanseområder til endogene hormonkonsentrasjoner eller deres respektive ratio er pålitelige verktøy innen dopinganalyse [67]. Dopingkontrollprøver som kommer inn til laboratorier for analyse, er anonyme. Selv om de nasjonale antidopingmyndighetene kan ta i bruk utøverkoder for identifisering av utøvere når de mottar testresultatene, er det av praktiske årsaker populasjonsbaserte grenser som fortsatt brukes. Grensene resulterer ikke i diagnostisk nøyaktighet, dette gjelder spesielt med hensyn på T/E-ratio [68].

Resultatene i denne oppgaven tyder, i likhet med mange andre studier, på at sensitiviteten til reaksjonsgrensen er for lav. Samtidig vil det å senke denne grensen øke risikoen for falske ”positive” prøver, noe som videre vil medføre betydelig merarbeid og beslag av ressurser med tanke på videre oppfølgingsundersøkelser.

Sottas *en al.* foreslo i 2006 en analysemetode som kombinerer både en populasjons- og individbasert tilnærming [69]. Ideen er hentet fra medisinske diagnostiske metoder som bruker en *bayesiansk* analyse av biomarkører. Hensikten er å indirekte avsløre dopingmisbruk, i motsetning til den tradisjonelle fremgangsmåten med direkte deteksjon av doping. Metoden går ut på at den første målingen i en rekke målinger som inngår i en longitudinal studie, sammenlignes med tradisjonelle populasjonsgrenser. Grensen snevres inn etter hvert som flere individuelle måleresultater integreres. Etter et fornuftig antall målinger, vil den opparbeidede serien av personlig data muliggjøre etableringen av individuelle referansegrenser [68].

WADA vedtok i desember 2009 retningslinjer for bruk av utøveres biologiske pass (Athlete Biological Passport, ABP), og dette ble umiddelbart tatt i bruk. ABP består av tre forskjellige moduler, hvorav kun den hematologiske foreløpig er tatt i bruk. På verdensbasis testes det i dag flere tusen toppidrettsutøvere for bloddoping. Steroidmodulen, som har til hensikt å detektere doping med AAS, vil inkludere individuell steroidprofil. Den siste er en endokrinologisk modul med mål om å oppdage bruk av for eksempel veksthormoner. De to sistnevnte modulene er imidlertid foreløpig i planleggingsfasen [70, 71]. Det er også mulig at ABP i fremtiden kan bli benyttet som grunnlag for å demonstrere at toppidrettsutøvere ikke har brukt prestasjonsfremmende midler før konkurranser. Individbaserte grenser vil gi et sikrere holdepunkt for eventuell startnekt i konkurranser.

Som denne oppgaven har demonstrert, kan genetisk variasjon ha stor betydning for utskillelse av blant annet testosteron. Utøvere med homozygot delesjon i UGT2B17-genet vil, med dagens populasjonsbaserte kriterier, potensielt kunne misbruke testosteron uten å bli oppdaget. Innføring av ABP vil i stor grad redusere problematikken rundt genetisk variasjon i forbindelse med biomarkører, og kan dermed være et viktig fremskritt innen dopinganalyse.

## Diskusjon

## 6 Konklusjon

Denne studien har vist at steroidprofilen hos menn påvirkes av UGT2B17-genotype, og da spesielt med hensyn til konsentrasjon av testosteron og T/E-ratio. Individer med intakte og delvis intakte alleler viste generelt høyere utskillelse av testosteronmetabolitter i urin enn individet med homozygot delesjon i begge alleler. En av studiedeltagerne (10 %) hadde homozygot delesjon i begge alleler av UGT2B17-genet.

Konsentrasjonene av testosteron og hovedmetabolittene viste generelt noe økning i konsentrasjon etter tilførsel av testosteron i form av gel og injeksjon. Dette gjaldt først og fremst deltagerne med *ins/del*- og *ins/ins*-genotype.

Studien har vist at den inter-individuelle variasjonen i T/E-ratio er mye høyere enn den intra-individuelle variasjonen. Av ti deltagere var det to deltagere som aldri overskred WADA's cut-off grense på 4 etter testosterontilførsel. Det synes derfor mer effektivt å bruke idrettsutøveren som sin egen referanse enn å benytte populasjonsbaserte grenser.

Denne oppgaven var opprinnelig ment å være det norske bidraget i et samarbeidsprosjekt mellom NLD og det WADA-akkrediterte laboratoriet i Beijing. Av ulike praktiske årsaker har samarbeidet foreløpig ikke kommet i gang, og tallmaterialet som presenteres i oppgaven er for lite til å kunne trekke klare konklusjoner. Oppgaven føyer seg likevel inn i rekken av vitenskapelige arbeider som kan argumentere for individbaserte referansegrenser i dopinglovgivningen. Ved bruk av individuelle steroidprofiler vil hver enkelt idrettsutøver få sine spesifikke normalverdier.

Til tross for eventuelle individbaserte grensekriterier i antidopinglovgivningen i fremtiden, vil det være utfordringer i forbindelse med bekreftelse av eksogent testosteron i lave doser. Dette gjelder spesielt hos utøvere med homozygot delesjon i UGT2B17-genet. Da testosteronnivåene i urinen er svært lave i utgangspunktet, er det vanskelig å bekrefte testosterontilførsel ved hjelp av IRMS-analyse.

## Konklusjon



# Litteraturliste

1. Stiftelsen Antidoping Norge, *Dopingens historie*. [cited 2012 04.02]; Available from: <http://www.antidoping.no/internett/medisinsk-info/hva-er-doping/dopingens-historie/>.
2. World Anti-Doping Agency, *A brief history of anti-doping*. 2010 [cited 2011 20.10]; Available from: <http://wada-ama.org/en/About-WADA/History/A-Brief-History-of-Anti-Doping/>.
3. Haug, E., P. Hemmersbach, and K. Birkeland, *Glimt fra idrettens dopinghistorie*. Tidsskrift for den Norske Laegeforening, 1999. **119**(17): p. 2538-2540.
4. Noakes, T.D., *Tainted glory—doping and athletic performance*. New England Journal of Medicine, 2004. **351**(9): p. 847-849.
5. Stiftelsen Antidoping Norge, *Hva er doping?* [cited 2012 04.04]; Available from: <http://www.antidoping.no/internett/medisinsk-info/hva-er-doping>.
6. World Anti-Doping Agency, *The 2012 Prohibited list International standard*. 2011 [cited 2012 07.04]; Available from: [http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-Prohibited-list/2012/WADA\\_Prohibited\\_List\\_2012\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/2012/WADA_Prohibited_List_2012_EN.pdf).
7. Hamilton, J.B., *Treatment of sexual underdevelopment with synthetic male hormone substance*. Endocrinology, 1937. **21**(5): p. 649.
8. Handelsman, D.J., *Testosterone: use, misuse and abuse*. Medical journal of Australia, 2006. **185**(8): p. 436.
9. Franke, W.W. and B. Berendonk, *Hormonal doping and androgenization of athletes: a secret program of the German Democratic Republic government*. Clinical chemistry, 1997. **43**(7): p. 1262-1279.
10. Basaria, S., *Androgen abuse in athletes: detection and consequences*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2010. **95**(4): p. 1533-1543.
11. Bhasin, S., et al., *The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men*. New England Journal of Medicine, 1996. **335**(1): p. 1-7.
12. Eriksson, A., et al., *Skeletal muscle morphology in power-lifters with and without anabolic steroids*. Histochemistry and Cell Biology, 2005. **124**(2): p. 167-175.
13. World Anti-Doping Agency, *2010 Adverse Analytical Findings and Atypical Findings Reported by Accredited Laboratories*. 2011 [cited 2012 03.03]; Available from: [http://www.wada-ama.org/Documents/Resources/Statistics/Laboratory\\_Statistics/WADA\\_2010\\_Laboratory\\_Statistics\\_Report.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/Resources/Statistics/Laboratory_Statistics/WADA_2010_Laboratory_Statistics_Report.pdf).
14. Sottas, P.E., et al., *From population-to subject-based limits of T/E ratio to detect testosterone abuse in elite sports*. Forensic science international, 2008. **174**(2): p. 166-172.
15. Mareck, U., et al., *Factors influencing the steroid profile in doping control analysis*. Journal of Mass Spectrometry, 2008. **43**(7): p. 877-891.
16. Catlin, D., et al., *Urinary testosterone (T) to epitestosterone (E) ratios by GC/MS. I. Initial comparison of uncorrected T/E in six international laboratories*. Journal of Mass Spectrometry, 1996. **31**(4): p. 397-402.
17. Donike, M., et al., *Nachweis von exogenem Testosteron*. Testosterone in sport: leistung und gesundheit, ed. H. Heck, et al. 1983, Köln: Deutscher Ärzte Verlag. 293-300.
18. Kerkhof, D.H., et al., *Evaluation of testosterone/epitestosterone ratio influential factors as determined in doping analysis*. Journal of analytical toxicology, 2000. **24**(2): p. 102-115.

19. Bowers, L.D., *Testosterone doping: Dealing with genetic differences in metabolism and excretion*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2008. **93**(7): p. 2469-2471.
20. Oftebro, H., *Evaluating an abnormal urinary steroid profile*. Lancet, 1992. **339**(8798): p. 941-942.
21. Borts, D.J. and L.D. Bowers, *Direct measurement of urinary testosterone and epitestosterone conjugates using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 2000. **35**(1): p. 50-61.
22. World Anti-Doping Agency, *WADA Technical Document - TD2004EAAS, Reporting and evaluation guidance for testosterone, epitestosterone, T/E ratio and other endogenous steroids*. 2004 [cited 2011 10.12]; Available from: [http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/end\\_steroids\\_aug\\_04.pdf](http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/end_steroids_aug_04.pdf).
23. Shackleton, C.H.L., et al., *Confirming testosterone administration by isotope ratio mass spectrometric analysis of urinary androstanediols*. Steroids, 1997. **62**(4): p. 379-387.
24. Schulze, J.J., et al., *Doping test results dependent on genotype of uridine diphosphoglucuronosyl transferase 2B17, the major enzyme for testosterone glucuronidation*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2008. **93**(7): p. 2500.
25. Belanger, A., et al., *Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferase enzymes in humans*. TRENDS in Endocrinology and Metabolism, 2003. **14**(10): p. 473-479.
26. Murata, M., E.H. Warren, and S.R. Riddell, *A human minor histocompatibility antigen resulting from differential expression due to a gene deletion*. The Journal of experimental medicine, 2003. **197**(10): p. 1279-1289.
27. Wilson, W., et al., *Characterization of a common deletion polymorphism of the UGT2B17 gene linked to UGT2B15*. Genomics, 2004. **84**(4): p. 707-714.
28. Jenny Jakobsson, et al., *Large Differences in Testosterone Excretion in Korean and Swedish Men Are Strongly Associated with a UDP-Glucuronosyl Transferase 2B17 Polymorphism*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2006. **91**: p. 687-693.
29. Store Norske Leksikon, *Polymorfisme*. 2011 [cited 2012 08.03]; Available from: [http://snl.no/sml\\_artikkel/polymorfisme](http://snl.no/sml_artikkel/polymorfisme).
30. Juul, A., et al., *A common deletion in the uridine diphosphate glucuronyltransferase (UGT) 2B17 gene is a strong determinant of androgen excretion in healthy pubertal boys*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2009. **94**(3): p. 1005-1011.
31. Demers, L.M., Whitley, R.J., *Function of adrenal cortex*, *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, ed. C.A. Burtis and E.R. Ashwood 1999, Philadelphia: W.B Saunders company.
32. Van Renterghem, P., et al., *Reference ranges for urinary concentrations and ratios of endogenous steroids which can be used as markers for steroid misuse, in a Caucasian population of athletes*. Steroids, 2010: p. 154-163.
33. Cawley, A., et al., *Searching for new markers of endogenous steroid administration in athletes*. Forensic science international, 2004. **143**(2-3): p. 103-114.
34. Wilson, J.D. and J.E. Griffin, *The use and misuse of androgens*. Metabolism, 1980. **29**(12): p. 1278-1295.
35. Snyder, P.J. *3 Endocrinology, II Testes and Testicular Disorders*. 2007 [cited 2012 02.03]; Available from: <http://www.acpmedicine.com/acp/chapters/ch0302.htm>.
36. Bremner, W.J., M.V. Vitiello, and P.N. Prinz, *Loss of circadian rhythmicity in blood testosterone levels with aging in normal men*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1983. **56**(6): p. 1278-1281.

37. Dehennin, L., *Secretion by the human testis of epitestosterone, with its sulfoconjugate and precursor androgen 5-androstene-3 $\beta$ , 17 $\alpha$ -diol*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 1993. **44**(2): p. 171-177.
38. Saudan, C., et al., *Testosterone and doping control*. British Journal of Sports Medicine, 2006. **40 Suppl 1**: p. i21-4.
39. Shackleton, C.H.L., et al., *Androstanediol and 5-androstenediol profiling for detecting exogenously administered dihydrotestosterone, epitestosterone, and dehydroepiandrosterone: potential use in gas chromatography isotope ratio mass spectrometry*. Steroids, 1997. **62**(10): p. 665-673.
40. Laboratoires Besins International, *Preparatomtale Testogel 50 mg/5 g*. 2008 [cited 2012 10.04]; Available from: [http://legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch\\_80333.aspx?SearchID=af29dc4d-6dbb-4c93-90a8-4c78855961fe](http://legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch_80333.aspx?SearchID=af29dc4d-6dbb-4c93-90a8-4c78855961fe).
41. Paranova, *Præparatomtale Testoviron Depot injeksjonsvæske, oppløsning 250 mg/ml*. 2012 [cited 2012 10.04]; Available from: <http://pro.medicin.dk/Medicin/Praeparater/433>.
42. Store Norske Leksikon, *Urin*. [cited 2012 08.03]; Available from: [http://snl.no/.sml\\_artikkel/urin](http://snl.no/.sml_artikkel/urin).
43. Chamberlain, J., *Analysis of drugs in biological fluids*. 3 ed. 1985, Florida, USA.
44. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kapittel 21: Introduksjon til prøveopparbeidelse*, in *Legemiddelanalyse*, 2004, Fagbokforlaget: Bergen.
45. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kapittel 18: Kvantitative analyser*, in *Legemiddelanalyse*, 2004, Fagbokforlaget: Bergen.
46. Geyer, H., et al., *Screening procedure for anabolic steroids—the control of the hydrolysis with deuterated androsterone glucuronide and studies with direct hydrolysis*. Recent advances in doping analysis (5). Sport und Buch Strauß, Köln, 1998: p. 99-102.
47. Norges laboratorium for dopinganalyse, *Arbeids- og analyseprosedyre, MD 10 Screening IV Dopingmidler*, 2010.
48. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kapittel 22: Væske-væske-ekstraksjon (LLE)*, in *Legemiddelanalyse*, 2004, Fagbokforlaget: Bergen.
49. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kapittel 17: Gasskromatografi* in *Legemiddelanalyse*, 2004, Fagbokforlaget: Bergen.
50. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kapittel 20: Massespektrometri*, in *Legemiddelanalyse*, 2004, Fagbokforlaget: Bergen.
51. Cawley, A.T. and U. Flenker, *The application of carbon isotope ratio mass spectrometry to doping control*. Journal of Mass Spectrometry, 2008. **43**(7): p. 854-864.
52. Piper, T., C. Emery, and M. Saugy, *Recent developments in the use of isotope ratio mass spectrometry in sports drug testing*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **401**(2): p. 433-47.
53. Piper, T., et al., *Investigations on changes in  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios of endogenous urinary steroids after pregnenolone administration*. Drug Testing and Analysis, 2011.
54. Cawley, A., et al., *Stable isotope ratio profiling of testosterone preparations*. Drug Testing and Analysis, 2010. **2**(11-12): p. 557-567.
55. Store Norske Leksikon, *Immunoassay*. 2011 [cited 2012 10.05]; Available from: [http://snl.no/.sml\\_artikkel/immunoassay](http://snl.no/.sml_artikkel/immunoassay).
56. PerkinElmer, *AutoDELFIa hLH Spec ,Time-resolved fluoroimmunoassay, Instructions for use*, 2011, Finland: PerkinElmer.

57. Liborg, I., *Steroidprofil, Etablering av en kvantitativ metode for endogene steroider* 2007, Universitetet i Oslo.
58. Weykamp, C., et al., *Steroid profile for urine: reference values*. Clinical chemistry, 1989. **35**(12): p. 2281.
59. Lindøe, M.K.C., *Virkningene av luteiniserende og gonadotropinfrigjørende hormoner på biomarkører i blod og urin*. 2007, Universitetet i Oslo.
60. Palonek, E., et al., *Serum and urinary markers of exogenous testosterone administration*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 1995. **55**(1): p. 121-127.
61. Dehennin, L. and A.M. Matsumoto, *Long-term administration of testosterone enanthate to normal men: alterations of the urinary profile of androgen metabolites potentially useful for detection of testosterone misuse in sport*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 1993. **44**(2): p. 179-189.
62. Karila, T., et al., *High doses of alcohol increase urinary testosterone-to-epitestosterone ratio in females*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1996. **687**(1): p. 109-116.
63. Falk, O., E. Palonek, and I. Björkhem, *Effect of ethanol on the ratio between testosterone and epitestosterone in urine*. Clinical chemistry, 1988. **34**(7): p. 1462-1464.
64. Occhiato, E.G., et al., *Selective non-steroidal inhibitors of 5 [alpha]-reductase type 1*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2004. **88**(1): p. 1-16.
65. Thevis, M., et al., *Doping-Control Analysis of the 5 [alpha]-Reductase Inhibitor Finasteride: Determination of Its Influence on Urinary Steroid Profiles and Detection of Its Major Urinary Metabolite*. Therapeutic drug monitoring, 2007. **29**(2): p. 236.
66. Tsivou, M., et al., *Stabilization of human urine doping control samples: II. Microbial degradation of steroids*. Analytical biochemistry, 2009. **388**(1): p. 146-154.
67. Donike M, M.-E.U., Geyer H, Nitschke R., *Evaluation of longitudinal studies, the determination of subject based reference ranges of the testosterone/epitestosterone ratio*, in *Recent Advances in Doping Analysis*, M. Donike, et al., Editors. 1993, Sport und Buch Strauß: Köln. p. 33.
68. Renterghem, P.V., *Alternative Steroid Profiling, Advances in Detection of Misuse with Endogenous Steroids in Sports*. 2010, Universiteit Gent.
69. Sottas, P.E., et al., *Bayesian detection of abnormal values in longitudinal biomarkers with an application to T/E ratio*. Biostatistics, 2007. **8**(2): p. 285-296.
70. World Anti-Doping Agency, *Questions & Answers on the Athlete Biological Passport*. 2011 [cited 2012 13.05]; Available from: <http://www.wada-ama.org/en/Science-Medicine/Athlete-Biological-Passport/Q--A-on-the-Athlete-Biological-Passport/>.
71. Sottas, P.E., et al., *The athlete biological passport*. Clinical chemistry, 2011. **57**(7): p. 969-976.

# 7 Appendiks

## Appendiks 1 – Tillaging av kalibratorløsninger

### Tillaging kalibratorløsning 1

Stoff	Bruksløsning	Uttak	masse totalt	Kons. (50ml) ng/ml
Testosteron	4 ng/μl	25 μl	100 ng	2
Epitestosteron	4 ng/μl	25 μl	100 ng	2
5α-androstadiol	20 ng/μl	25 μl	500 ng	10
5β-androstadiol	20 ng/μl	25 μl	500 ng	10
6β-OH-androsteron	10 ng/μl	40 μl	400 ng	8
6β-OH-etikolanolon	10 ng/μl	50 μl	500 ng	10
11β-OH-androsteron	10 ng/μl	25 μl	750 ng	15
11β-OH-etikolanolon	10 ng/μl	25 μl	500 ng	10
Androsteron	100 ng/μl	50 μl	5 000 ng	100
Etikolanolon	100 ng/μl	50 μl	5 000 ng	100
DHT	4 ng/μl	25 μl	100 ng	2
DHEA	4 ng/μl	25 μl	100 ng	2
Pregnandiol	4 ng/μl	25 μl	100 ng	10

### Tillaging kalibratorløsning 2

Stoff	Bruksløsning	Uttak	masse totalt	Kons. (50ml) ng/ml
Testosteron	4 ng/μl	250 μl	1 000 ng	20
Epitestosteron	4 ng/μl	250 μl	1 000 ng	20
5α-androstadiol	100 ng/μl	50 μl	5 000 ng	100
5β-androstadiol	100 ng/μl	50 μl	5 000 ng	100
6β-OH-androsteron	100 ng/μl	40 μl	4 000 ng	80
6β-OH-etikolanolon	100 ng/μl	50 μl	5 000 ng	100
11β-OH-androsteron	100 ng/μl	75 μl	7 500 ng	150
11β-OH-etikolanolon	100 ng/μl	50 μl	5 000 ng	100
Androsteron	1000 ng/μl	50 μl	50 000 ng	1000
Etikolanolon	1000 ng/μl	50 μl	50 000 ng	1000
DHT	4 ng/μl	250 μl	1 000 ng	20
DHEA	4 ng/μl	250 μl	1 000 ng	20
Pregnandiol	100 ng/μl	50 μl	5 000 ng	100

### Tillaging kalibratorløsning 3

Stoff	Bruksløsning	Uttak	masse totalt	Kons. (50ml) ng/ml
Testosteron	100 ng/μl	30 μl	3 000 ng	60
Epitestosteron	100 ng/μl	30 μl	3 000 ng	60
5α-androstadiol	100 ng/μl	150 μl	15 000 ng	300
5β-androstadiol	100 ng/μl	150 μl	15 000 ng	300
6β-OH-androsteron	100 ng/μl	120 μl	12 000 ng	240
6β-OH-etikolanolon	100 ng/μl	150 μl	15 000 ng	300
11β-OH-androsteron	100 ng/μl	225 μl	22 500 ng	450
11β-OH-etikolanolon	100 ng/μl	150 μl	15 000 ng	300
Androsteron	1000 ng/μl	150 μl	150 000 ng	3000
Etikolanolon	1000 ng/μl	150 μl	150 000 ng	3000
DHT	4 ng/μl	750 μl	3 000 ng	60
DHEA	100 ng/μl	30 μl	3 000 ng	60
Pregnandiol	100 ng/μl	150 μl	15 000 ng	300

## Appendiks

### Tillaging kalibratorløsning 4

Stoff	Bruksløsning	Uttak	masse totalt	Kons. (50ml) ng/ml
Testosteron	100 ng/μl	70 μl	7 000 ng	140
Epitestosteron	100 ng/μl	70 μl	7 000 ng	140
5α-androstandiol	1000 ng/μl	35 μl	35 000 ng	700
5β-androstadiol	100 ng/μl	350 μl	35 000 ng	700
6β-OH-androsteron	1000 ng/μl	28 μl	28 000 ng	560
6β-OH-etikolanolon	1000 ng/μl	35 μl	35 000 ng	700
11β-OH-androsteron	1000 ng/μl	52,5 μl	52 500 ng	1050
11β-OH-etikolanolon	1000 ng/μl	35 μl	35 000 ng	700
Androsteron	1000 ng/μl	350 μl	350 000 ng	7000
Etikolanolon	1000 ng/μl	350 μl	350 000 ng	7000
DHT	200 ng/μl	35 μl	7 000 ng	140
DHEA	100 ng/μl	70 μl	7 000 ng	140
Pregnandiol	1000 ng/μl	35 μl	35 000 ng	700

### Tillaging kalibratorløsning 5

Stoff	Bruksløsning	Uttak	masse totalt	Kons. (50ml) ng/ml
Testosteron	100 ng/μl	100 μl	10000 ng	200
Epitestosteron	100 ng/μl	100 μl	10000 ng	200
5α-androstandiol	1000 ng/μl	50 μl	50 000 ng	1000
5β-androstadiol	100 ng/μl	500 μl	50 000 ng	1000
6β-OH-androsteron	1000 ng/μl	40 μl	40 000 ng	800
6β-OH-etikolanolon	1000 ng/μl	50 μl	50 000 ng	1000
11β-OH-androsteron	1000 ng/μl	75 μl	75 000 ng	1500
11β-OH-etikolanolon	1000 ng/μl	50 μl	50 000 ng	1000
Androsteron	1000 ng/μl	500 μl	500 000 ng	10000
Etikolanolon	1000 ng/μl	500 μl	500 000 ng	10000
DHT	200 ng/μl	50 μl	10 000 ng	200
DHEA	100 ng/μl	100 μl	10 000 ng	200
Pregnandiol	1000 ng/μl	50 μl	50 000 ng	1000

## Appendiks 2 – Informasjonsskjema for deltageren

### Forespørsel om deltakelse i forskningsprosjektet

#### ***”Utskillelse av testosteronmetabolitter i urin etter anvendelse av testosteron i forskjellige applikasjonsformer – En sammenlikning mellom asiatiske og kaukasiske menn”***

##### **Bakgrunn og hensikt**

Dette er et spørsmål til deg om å delta i en forskningsstudie som er et samarbeidsprosjekt mellom Norges laboratorium for dopinganalyse og Kinas laboratorium for dopinganalyse i Beijing.

En viktig parameter for å avdekke misbruk av testosteron er å måle konsentrasjon og forholdet mellom utvalgte testosteronmetabolitter i urin. Det er vist at utskillelse av enkelte av disse er forskjellig hos asiatiske sammenlignet med kaukasiske menn. Dette skyldes en variasjon i et gen, UGT2B17. Hensikten med studien er å forbedre eksisterende analyse for å avdekke misbruk av testosteron og få økt kunnskap om deteksjonstid etter bruk av to ulike testosteronpreparater.

##### **Hva innebærer studien?**

Deltagelse innebærer applikasjon av to testosteronpreparater. Et preparat, Testogel, som smøres på huden hver morgen i 7 dager. Det avgis en urinprøve hver morgen de siste 5 dagene før, om morgenen før hver applikasjon og deretter om morgenen de påfølgende 7 dager.

4 uker etter at applikasjonen av Testogel er avsluttet gis det en injeksjon med preparatet Testoviron. Det samles en urinprøve om morgenen før injeksjon og deretter i ytterligere 14 dager etter injeksjonen.

Før oppstart vil det bli tatt en blodprøve som vil brukes til å karakterisere UGT2B17-genet.

Mens studien pågår og i de påfølgende to måneder kan du ikke delta i idrettskonkurranser. Bruk av testosteron i de dosene som er angitt her vil ikke ha prestasjonsfremmende effekt, men kan potensielt gi positivt svar i en eventuell dopingtest.

##### **Mulige ulemper**

Preparatene som brukes i denne studien er registrerte legemidler. Testogel er registrert og godkjent i Norge og Testoviron er registrert og godkjent i Danmark. De er godkjente for behandling av menn som ikke selv produserer testosteron. Dosene som brukes i denne studien tilsvarer det som anvendes i medisinsk behandling. Kroppens egenproduksjon vil reduseres noe inntil testosteronpreparatene er utskilt. Siden de anvendte dosene tilsvarer kroppens normale egenproduksjon, vil forsøkspersonene ha en kortvarig periode med lett/moderat økning av testosteron. Erfaring indikerer at kroppens egenproduksjon av testosteron raskt vil normaliseres etter avsluttet behandling.

Ved injeksjon kan det oppstå noe ubehag ved injeksjonsstedet.

### Hva skjer med prøvene og informasjonen om deg?

Prøvene tatt av deg og informasjonen som registreres om deg skal kun brukes slik som beskrevet i hensikten med studien. Alle opplysningene og prøvene vil bli behandlet uten navn og fødselsnummer eller andre direkte gjenkjenneriske opplysninger. En kode knytter deg til dine opplysninger og prøver gjennom en navneliste. Det er kun autorisert personell knyttet til prosjektet som har adgang til navnelisten og som kan finne tilbake til deg. Dersom deltakere er medlem av et idrettslag vil Antidoping Norge bli informert om dette, men resultater vil ikke utleveres sammen med navn.

Det vil ikke være mulig å identifisere deg i resultatene av studien når disse publiseres.

### Frivillig deltakelse

Det er frivillig å delta i studien. Du kan når som helst og uten å oppgi noen grunn trekke ditt samtykke til å delta i studien. Dersom du ønsker å delta, undertegner du samtykkeerklæringen på siste side. Om du nå sier ja til å delta, kan du senere trekke tilbake ditt samtykke.

Dersom du senere ønsker å trekke deg eller har spørsmål til studien, kan du kontakte prosjektleder Ingunn Riise Hullstein på telefon 22 89 43 14 (evt mobil 950 20 150), eller masterstudent

Thomas Svendsen på telefon 41 90 63 18.

### Kriterier for deltakelse

Til studien trenger vi friske menn, fortrinnsvis i alderen 20-40 år. Deltakerne må ha normalt blodtrykk. Du kan ikke delta i studien hvis du har eller har hatt nyre-, hjerte- eller leversykdom. Har du eller har du hatt prostatakreft kan du heller ikke delta i studien.

Av etiske grunner kan du heller ikke delta i idrettskonkurranser mens studien pågår eller i de to påfølgende måneder. Dosene som brukes i denne studien vil ikke gi prestasjonsfremmende effekt, men preparatene som skal brukes står på WADA's forbudsliste og kan gi positivt svar i en dopingkontroll.

### Tidsskjema – hva skjer og når skjer det?

Studien forventes å starte opp i mai/juni 2011. Ved oppstart deles det ut et detaljert flytskjema og flasker til urinprøver. Urinprøver samles hos deltaker og oppbevares i fryser, ved ca -20 °C og leveres samlet (eller etter annen avtale).

Det avgis en urinprøve, om morgenen de siste 5 dagene før første applikasjon av Testogel. Testogel deles ut ved oppmøte på Norges laboratorium for dopinganalyse, Aker sykehus Bygg 23, Trondheimsveien 235. Det tas samtidig en blodprøve.

Angitt mengde Testogel smøres på huden hver morgen i 7 dager.

Fire uker etter avsluttet behandling med Testogel, gis det en injeksjon Testoviron, ved oppmøte i Norges laboratorium for dopinganalyse.

Det skal avgis totalt 33 urinprøver (fortrinnsvis morgenurin) i forbindelse med studien. Dette vil være detaljert beskrevet i flytskjemaet som deles ut ved oppstart.



## Appendiks

### Risikovurdering

Det kan oppstå forbigående ubehag på injeksjonsstedet i forbindelse med injeksjonen. De anførte dosene tilsvarer dosene som anvendes i behandlingen av menn med testosteronmangel. Dosene må forventes å redusere kroppens egenproduksjon inntil testosteronpreparatene er utskilt. Siden de anvendte dosene tilsvarer kroppens normale egenproduksjon, vil forsøkspersonene ha en kortvarig periode med lett/moderat forhøyede testosteronkonsentrasjoner. Erfaring indikerer at kroppens egenproduksjon av testosteron vil normaliseres etter avsluttet behandling. Risikoen for at forsøkspersonenes egen testosteronproduksjon påvirkes utover tiden studien pågår er minimal.

### Biobank

Urinprøvene og blodprøven som blir tatt og informasjonen utledet av dette materialet vil bli lagret i en forskningsbiobank ved Norges laboratorium for dopinganalyse. Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også samtykke til at det biologiske materialet og analyseresultater inngår i biobanken. Ingunn Riise Hullstein er ansvarshavende for forskningsbiobanken. Biobanken planlegges å vare til 2015. Etter dette vil materiale og opplysninger bli destruert og slettet etter interne retningslinjer. Analyseresultatene vil oppbevares i 10 år etter publiseringsdato (i henhold til regler for ettersyn av publiserte data), antatt år 2022.

### Utlevering av materiale og opplysninger til andre

Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også ditt samtykke til at prøver og aidentifiserte opplysninger utleveres til National Anti-Doping Laboratory, Beijing (WADA akkreditert laboratorium) som er samarbeidslaboratorium i dette prosjektet (Dette kan være land med lover som ikke tilfredsstiller europeisk personvernlovgivning). Analyse av urinprøver er planlagt utført både ved Norges laboratorium for dopinganalyse og ved National Anti-Doping Laboratory, Beijing.

Blodprøven er planlagt analysert ved Rigshospitalet, København.

### Rett til innsyn og sletting av opplysninger om deg og sletting av prøver

Hvis du sier ja til å delta i studien, har du rett til å få innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg. Du har videre rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene vi har registrert. Dersom du trekker deg fra studien, kan du kreve å få slettet innsamlede prøver og opplysninger, med mindre opplysningene allerede er inngått i analyser eller brukt i vitenskapelige publikasjoner.

### Økonomi

Studien og biobanken er delvis finansiert gjennom forskningsmidler fra Antidoping Norge. Resterende finansieres gjennom interne midler.

### Forsikring

Det er tegnet forsikring i Legemiddelansvarsforening for 2011.

### Informasjon om utfallet av studien

Resultatene vil bli publisert/presentert etter statistisk behandling av analyseresultatene. Det vil derfor ikke bli gitt ut resultater av enkeltpersoner. Rett til innsyn for den enkelte, se ovenfor.

## Appendiks 3 – Flytskjema for prøvetakingsperiode

### Del 1 - Testogel

Morgenurin i 5 dager **før** Testogel-applisering  
(kryss av for utført)

Dag 1	<input type="checkbox"/>
Dag 2	<input type="checkbox"/>
Dag 3	<input type="checkbox"/>
Dag 4	<input type="checkbox"/>
Dag 5	<input type="checkbox"/>
Dag 6	<input type="checkbox"/>
Dag 7	<input type="checkbox"/>
Dag 8	<input type="checkbox"/>
Dag 9	<input type="checkbox"/>
Dag 10	<input type="checkbox"/>
Dag 11	<input type="checkbox"/>
Dag 12	<input type="checkbox"/>
Dag 13	<input type="checkbox"/>
Dag 14	<input type="checkbox"/>
Dag 15	<input type="checkbox"/>
Dag 16	<input type="checkbox"/>
Dag 17	<input type="checkbox"/>
Dag 18	<input type="checkbox"/>
Dag 19	<input type="checkbox"/>

Testogel påført **etter** morgenurin

<input type="checkbox"/>	(dag 5)
<input type="checkbox"/>	(dag 6)
<input type="checkbox"/>	(dag 7)
<input type="checkbox"/>	(dag 8)
<input type="checkbox"/>	(dag 9)
<input type="checkbox"/>	(dag 10)
<input type="checkbox"/>	(dag 11)

Eventuelle merknader\*


#### Testogelpåføring:

1 gang daglig til omtrent samme tid, fortrinnsvis om morgenen.

Etter åpning av doseposen tas hele innholdet ut og påføres umiddelbart.

Påføres forsiktig i et tynt lag på ren, tørr og frisk hud over begge skuldre, begge armer eller magen. Innmassering er ikke nødvendig. Skal tørke i minst 3-5 minutter før påkledning.

Vask hendene etter påføring.

### Del 2 - Testoviron injeksjon

Dag 0 Injeksjon av Testoviron Depot  
Morgenurin (kryss av for utført)

Dag 1	<input type="checkbox"/>
Dag 2	<input type="checkbox"/>
Dag 3	<input type="checkbox"/>
Dag 4	<input type="checkbox"/>
Dag 5	<input type="checkbox"/>
Dag 6	<input type="checkbox"/>
Dag 7	<input type="checkbox"/>
Dag 8	<input type="checkbox"/>
Dag 9	<input type="checkbox"/>
Dag 10	<input type="checkbox"/>
Dag 11	<input type="checkbox"/>
Dag 12	<input type="checkbox"/>
Dag 13	<input type="checkbox"/>
Dag 14	<input type="checkbox"/>

Eventuelle merknader\*


#### \*Merknader:

Det har tidligere blitt vist at enkelte legemidler og stort inntak av alkohol kan påvirke utskillelsen av testosteronmetabolitter. Du bes derfor om å oppgi dette under merknader den gjeldende dag, dersom du har konsumert mer enn 1-2 enheter alkohol, eller bruker betennelsesdempende legemidler som ibuprofen (eks. Ibux) eller diklofenak (Voltaren)

**Spørsmål?** -Ikke nøl med å ta kontakt!

Thomas Svendsen - Mastergradstudent  
thomsv@student.farmasi.uio.no / 41906318

Ingunn Hullstein - Prosjektansvarlig  
ingunn.hullstein@h-lab.no / 22894314

